

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Protéomique du lysosome: caractérisation d'un candidat protéiné de la membrane des lysosomes

Delsaute, Anne-Françoise

Award date:
2004

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



**FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR**

Faculté des Sciences

**PROTEOMIQUE DU LYSOSOME :
CARACTERISATION D'UN CANDIDAT PROTEINE DE LA MEMBRANE
DES LYSOSOMES**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
licencié en Sciences biologiques**

Anne-Françoise DELSAUTE

Juin 2004

Protéomique du lysosome : caractérisation d'un candidat protéine de la membrane des lysosomes

Delsaute Anne-Françoise

Résumé

Dans le but d'élargir les connaissances actuelles sur les lysosomes, l'équipe du Professeur Garin (Grenoble), tente d'identifier de nouvelles protéines membranaires lysosomales à partir de fractions de foie de rat enrichies en lysosomes. Au sein de ces fractions préparées dans notre laboratoire, ce sont principalement les protéines les plus hydrophobes qui sont ciblées et identifiées par spectrométrie de masse. Parmi les molécules identifiées lors de ces travaux, se trouve une protéine inconnue d'un poids moléculaire théorique de 40 kDa (p40) qui mérite toute notre attention puisque l'analyse de sa séquence révèle plusieurs segments hydrophobes ainsi que d'éventuels motifs d'adressage aux lysosomes (motifs di-leucine et tyrosine).

Notre mémoire a été consacré à l'étude de l'insertion membranaire de P40 ainsi que sa topologie, le nombre exact de segments transmembranaires ainsi que l'orientation des extrémités N- et C-terminales étant incertains. Afin de répondre à ces questions, nous avons produit diverses constructions moléculaires : d'une part, nous avons créé 2 mutants de glycosylation en insérant des sites consensus de glycosylation dans les 2 premières boucles hydrophiles de la protéine et, d'autre part, nous avons greffé la GFP aux 2 extrémités de p40. Nous avons utilisé un système de traduction *in vitro*, en présence ou en absence de microsomes pour étudier la synthèse de ces protéines. Les produits de traduction ont été analysés par partition dans le Triton X-114, extraction des membranes à l'aide de carbonate pH 11.5 et digestion par la protéinase K et par la trypsine. Nous avons montré que les sites potentiels de glycosylation de p40 ne sont pas utilisés. L'absence de glycosylation des mutants obtenus par l'insertion de deux sites de glycosylation supplémentaires rend plus difficile encore l'élaboration d'un modèle topologique définitif. Toutefois, de l'ensemble de nos résultats, nous pouvons conclure que p40 est une protéine très hydrophobe, associée aux membranes et dont les extrémités N- et C-terminales pourraient être externes, c'est-à-dire cytoplasmique dans le contexte cellulaire.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Juin 2004

Promoteur: M. Jadot

Directeur-Tuteur: I. Hamer

Q'auraient été ces six mois de « dur labeur » sans l'accueil et les encouragements de tous les urphymiennes et urphymiens, en particulier ceux du laboratoire de Chimie Physiologique.

Pour m'avoir offert l'opportunité de faire mon mémoire dans son laboratoire, pour sa patience, ses conseils et sa rigueur scientifique, je tiens tout d'abord à remercier le Professeur M. Jadot.

Pour m'avoir guidée et suivie tout au long de mes manipulations, pour ses nombreux conseils et pour avoir consacré beaucoup de son temps libre à la confection de ce travail, je remercie Isabelle Hamer.

Pour son soutien, sa complicité et pour avoir partagé avec moi, ces quelques mois, tous les secrets de p40, je dis merci à Marielle. Je remercie également Mme Mertens et Mr Flamion pour avoir suivi le projet p40 de très près et pour nous avoir généreusement fourni l'anticorps anti-GFP. Merci aussi à Mr De Bolle pour sa discussion très enrichissante au sujet de la GFP.

Je n'oublie évidemment pas Michel Savels pour sa bonne humeur quotidienne et pour son aide informatique, Arlette et « Dame » Jacqueline toujours prêtes à répondre à mes questions, pour les encouragements et pour les petites pauses de « 4 h –10 anti-déprime », Michèle pour les agréables discussions, Mme et Mr Wattiaux pour leurs conseils et leurs encouragements, Marie-Jeanne, Marie-France, Marie-Thérèse, Fanja, Marie-Christine, Mr Mainferme et Mr Van Dyck pour leur aide et leur soutien.

Je remercie ensuite toute ma famille et plus particulièrement ma maman, toujours là en cas de pépin, grâce à laquelle j'ai pu accomplir ces études, ainsi que Vanessa, Virginie, Sophie (notre demi du labo !) et Aurélie pour leur présence, leur réconfort et leurs encouragements.

Liste des abréviations

AA	acide aminé
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire
AP	protéine adaptatrice
APS	<i>Ammonium persulfate</i>
ARF	<i>ADP-ribosylation factor</i>
ARN	acide ribonucléique
ARNm	acide ribonucléique messenger
ARNt	acide ribonucléique de transfert
ATP	adénosine triphosphate
CFTR	<i>cystic fibrosis transmembrane regulator</i>
DTT	dithiothréitol
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GGA	<i>Golgi-localizing, γ adaptatin ear homology domain, ARF-binding</i>
LAMP	<i>lysosome-associated membrane protein</i>
LAP	<i>lysosomal acid phosphatase</i>
LB	<i>Lennox Broth</i>
LIMP	<i>lysosome integral membrane protein</i>
M6P	mannose-6-phosphate.
M6PR	récepteur au mannose-6 phosphate
OST	oligosaccharyl transférase
pb	paire de bases
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PK	protéinase K
PM	poids moléculaire
PMSF	<i>phenylmethylsulfonyl fluoride</i>
RE	reticulum endoplasmique
rNTP	ribonucléoside triphosphate
RRL	lysate de réticulocytes de lapin
SBTI	<i>soybean trypsin inhibitor</i>
SDS	<i>sodium dodecylsulfate</i>
SRP	<i>signal-recognition particle</i>
TCA	acide trichloroacétique
TEMED	N,N,N',N'-tétraméthylethylène diamine
TGN	<i>trans golgi network</i>

Table des matières

Introduction	3
1. Les lysosomes	3
1.1. Généralités	3
1.2. Constituants des lysosomes	4
1.2.1. La lumière lysosomale	4
1.2.2. La membrane lysosomale	4
➤ Les protéines « majeures » de la membrane	4
A. Les LAMPs	4
B. Les LIMPs	5
➤ Les protéines « mineures » de la membrane	6
A. Pompe à protons (V-type H ⁺ ATPase)	6
B. La cystinosine	6
C. La sialine	7
D. Autres protéines	7
1.3. Biosynthèse et transport des protéines lysosomales	7
1.3.1. Biosynthèse et translocation	7
➤ Protéines solubles	7
➤ Protéines membranaires	8
A. Les protéines avec un seul segment transmembranaire	8
B. Les protéines polytopiques	8
1.3.2. Trafic intracellulaire des protéines lysosomales	9
➤ Protéines solubles	9
➤ Protéines membranaires	10
A. Les motifs d'adressage aux lysosomes	10
B. Les protéines adaptatrices	11
2. Etudes Protéomiques des organites subcellulaires	13
2.1. Généralités	13
2.2. Protéomique des organites	14
2.2.1. Le noyau	14
2.2.2. Les mitochondries	14
2.2.3. L'appareil de Golgi	15
2.2.4. Les endosomes	16
2.2.5. Les lysosomes	16
➤ Purification des lysosomes	17
➤ Etude protéomique des hydrolases acides	17
➤ Etude protéomique des protéines membranaires	17
3. Objectifs de travail	18
Matériel et Méthodes	20
1. Obtention de mutants par biologie moléculaire	20
1.1. Amplification de l'ADN par PCR	20
1.1.1. Construction p40 G37N	20
1.1.2. Construction p40 A77N	20
1.1.3. Construction p40-GFP	21
1.1.4. Construction GFP-p40	21
1.2. Ligation	21
1.3. Transformation bactérienne	22
1.4. Minipréparation d'ADN et digestions contrôles	22
1.5. Maxipréparation d'ADN	22
2. Transcription <i>in vitro</i>	23
3. Traduction <i>in vitro</i>	23
3.1. Système de traduction <i>in vitro</i>	23
3.2. Partition dans le Triton X-114	23

3.3.	Association membranaire	24
3.3.1.	Centrifugation sur coussin de saccharose	24
3.3.2.	Extraction au Carbonate	24
3.4.	Digestion avec la Protéinase K	24
3.5.	Digestion avec la Trypsine	24
3.6.	Préparation de microsomes de foie de rat	25
4.	Expression de p40 dans les cellules COS	25
5.	Immunoprécipitation	25
6.	Electrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS	26
6.1.	Gels d'acrylamide en présence de Tris-Glycine	26
6.2.	Gels d'acrylamide en présence de Tris-Tricine	27
Résultats et discussion		28
1.	Propriétés intrinsèques de P40	28
1.1.	Transcription in vitro	29
1.2.	Traduction in vitro	29
1.2.1.	Partition dans le Triton X-114	30
1.2.2.	Association membranaire	31
➤	Sédimentation sur coussin de saccharose	31
➤	Extraction au carbonate	31
1.2.3.	Digestion avec la protéinase K	32
2.	Etude de la topologie membranaire de p40 par insertion de sites consensus de glycosylation	34
2.1.	Obtention de mutants de glycosylation par biologie moléculaire.	34
2.1.1.	G37N	34
2.1.2.	A77N	35
➤	Mutagenèse dirigée avec le kit de Stratagène	35
➤	Méthode classique	36
2.2.	Expression in vitro des mutants de glycosylation	36
2.2.1.	Traduction in vitro en absence de microsomes	36
2.2.2.	Traduction in vitro en présence de microsomes	37
3.	Etude de la topologie membranaire de p40 par digestion protéolytique	39
3.1.	Obtention des protéines chimériques	39
3.1.1.	P40-GFP	39
➤	Transfert du cDNA de p40 dans le vecteur pEGFP-N1	39
➤	Sous clonage de p40-GFP dans pCMV•SPORT6	40
3.1.2.	GFP-p40	40
3.2.	Traduction in vitro des protéines chimériques	40
3.3.	Digestion des protéines chimériques avec la protéinase K	42
3.4.	Digestion des protéines chimériques avec la trypsine	44
Discussion générale et Perspectives		49
Références bibliographiques		54

Proteolytic pathway	Glycanolytic pathway	Nuclease pathway	Lipolytic pathway
Cathepsin D Cathepsin B Cathepsin H Cathepsin L (Glycosidases and phospho- protein phosphatase also act on intact proteins) Tripeptidyl peptidase Dipeptidyl peptidase I Dipeptidyl peptidase II Arginyl aminopeptidase (cathepsin H) Peptidyl dipeptidase C (cathepsin B) Carboxypeptidase A Carboxypeptidase B Prolyl carboxypeptidase Tyrosine carboxypeptidase Dipeptidase I Dipeptidase II	Hyaluronidase Heparin endoglucuronidase Heparan sulfate endoglycosidase Lysozyme α -L-Fucosidase α -Galactosidase β -Galactosidase α -Glucosidase β -Glucosidase α -N-Acetylgalactosaminidase α -N-Acetylglucosaminidase β -N-Acetylglucosaminidase β -Glucuronidase α -L-Iduronidase α -Mannosidase β -Mannosidase Neuraminidase β -Aspartylglucosylaminase Chondroitin 6-sulfatase Heparin sulfamatase Iduronosulfatase Sulfatases A and B	Ribonuclease II Deoxyribonuclease II Exonuclease (5'-terminal) Acid phosphatase (There are additional enzymes with phosphodiesterase, pyrophosphatase, nucléoside triphosphatase, and phosphoamidase activities in lysosomes)	Triacylglycerol lipase Phospholipase A ₁ Phospholipase A ₂ Phosphatidate phosphatase Acylsphingosine deacylase Sphingomyelin phosphodiesterase (Other enzymes including glycosidases and sulphatases also make important contributions to the lipolytic pathway. Moreover, there are necessary 'activator' proteins)

Tableau I : Enzymes lysosomales (d'après Holtzman, 1989)

INTRODUCTION

1. LES LYSOSOMES

1.1. GENERALITES

Découverts en 1950 par le professeur de Duve et son équipe, les lysosomes sont des organites des cellules eucaryotes. Ils sont délimités par une membrane unique et leur taille varie de 0,2 à 0,5 μm . Ils renferment de nombreuses hydrolases acides qui possèdent une activité optimale à un pH proche de 5, correspondant au pH de la lumière lysosomale.

Etant donné que le lysosome est le site intracellulaire majeur pour la dégradation d'une grande variété de macromolécules, il est important que son contenu reste bien séparé du reste de la cellule. A cette fin, la membrane des lysosomes possède des protéines membranaires fortement glycosylées qui la protégeraient de l'action des hydrolases (Kornfeld et Mellman, 1989 ; Kundra et Kornfeld, 1999). Le pH luminal est maintenu acide grâce à une pompe à proton membranaire qui hydrolyse l'ATP pour apporter des H^+ à l'intérieur des lysosomes.

La membrane lysosomale abrite également plusieurs transporteurs permettant l'acheminement des produits de dégradation vers le cytosol où ceux-ci pourront être recyclés ou éliminés par la cellule (Braulke, 1996; Eskelinen et al., 2003).

Le lysosome est un carrefour entre la voie biosynthétique et la voie catabolique. D'une part, le lysosome est la destination finale des protéines lysosomales nouvellement synthétisées et nécessaires à sa fonction de dégradation. D'autre part, celui-ci est aussi la destination finale de beaucoup de matériaux endocytés et autophagiques destinés à être dégradés (Kornfeld et Mellman, 1989). La dégradation lysosomale est critique dans beaucoup de processus physiologiques tels que le "turnover" normal de nombreuses protéines cellulaires, l'élimination des protéines anormales, la "downregulation" des récepteurs de surface, la libération de nutriments endocytés, l'inactivation d'organismes pathogènes et la présentation des antigènes à la membrane plasmique. De plus, le lysosome joue un rôle dans l'homéostasie des ions métalliques et dans la réparation de la membrane plasmique (Mullins et Bonifacino, 2001).

En microscopie électronique, les lysosomes apparaissent fortement hétérogènes et denses aux électrons (Holtzman, 1989). Cette hétérogénéité provient de la diversité des matériaux destinés à la dégradation. Mais bien qu'ils aient des tailles et des formes variables, on peut les repérer avec des colorations spécifiques (phosphatase acide) ou des anticorps spécifiques dirigés contre leurs glycoprotéines membranaires ou leurs hydrolases (Mullins et Bonifacino, 2001).

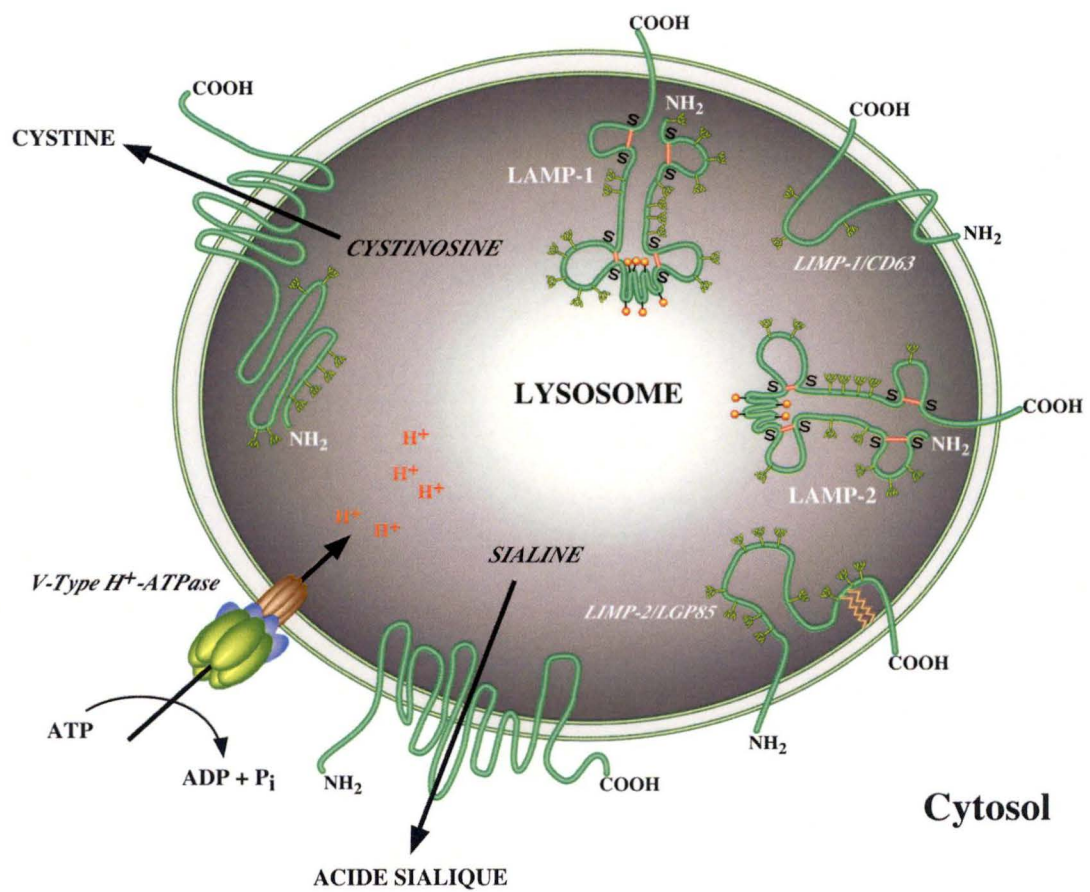


Figure 1 : Représentation schématique des protéines lysosomales membranaires connues (d'après Eskelinen et al., 2003).

1.2. CONSTITUANTS DES LYSOSOMES

1.2.1. La lumière lysosomale

Une cinquantaine d'hydrolases acides ont été identifiées dans les lysosomes : leur action coordonnée permet d'assurer diverses réactions du catabolisme (Holtzman, 1989). On ne connaît pas encore le rôle précis de chacune d'entre elles mais on peut les répartir en différentes familles selon les substrats hydrolysés : il y a des protéases, des nucléases, des phosphatases, des sulfatases, des lipases et des glycosidases (Tableau I).

1.2.2. La membrane lysosomale

Les protéines membranaires des lysosomes sont moins bien connues que les protéines solubles (figure 1).

➤ Les protéines « majeures » de la membrane

La membrane des lysosomes contient un grand nombre de protéines fortement glycosylées possédant une courte queue cytoplasmique : les protéines LAMPs (*lysosome-associated membrane proteins*) et LIMPs (*lysosome integral membrane proteins*) (Eskelinen et al., 2003). Ces protéines représentent plus de 50 % de l'ensemble des protéines membranaires des endosomes tardifs et des lysosomes. Pendant très longtemps, on a pensé que ces protéines n'avaient qu'un rôle structural mais de plus en plus, il apparaît qu'elles jouent un rôle fonctionnel (voir plus loin).

Les protéines LAMPs et LIMPs sont des protéines riches en hydrates de carbones. Une grande partie de leur poids moléculaire est due à la présence de chaînes oligosaccharidiques. Plusieurs études ont été réalisées afin de découvrir le rôle de la partie glucidique de ces protéines sur leurs fonctions. Dans le passé, la tunicamycine, un antibiotique qui inhibe le transfert du premier N-acétyl glucosamine sur le dolichol (une des premières étapes de la glycosylation) (voir point 1.3.1) était souvent utilisée pour étudier le rôle protecteur des oligosaccharides contre la protéolyse. Toutefois, l'absence totale de chaînes oligosaccharidiques empêche généralement le repliement correct de la protéine étudiée et induit sa dégradation dans le réticulum endoplasmique (Sidrauski et al., 1998). Pour éviter ce problème, d'autres études ont utilisé une approche alternative, à savoir l'endocytose de l'endoglycosidase H (Kundra et Kornfeld, 1999). L'endoglycosidase H clive les chaînes haut-mannose des protéines complètement repliées. Une fois dans la voie endocytaire, l'endoglycosidase H est capable d'enlever les chaînes d'oligosaccharides sur les protéines LAMPs. La déglycosylation de LAMP-1 et LAMP-2 résulte en leur rapide dégradation tandis que LIMP-2 reste relativement stable. Cette étude démontre que les oligosaccharides liés à une asparagine protègent une partie des protéines membranaires lysosomales de la digestion protéolytique (Kundra et Kornfeld, 1999).

A. Les LAMPs.

Les protéines LAMP-1 et LAMP-2 (100-120 kDa) sont des protéines membranaires de type I: leur extrémité N-terminale est luminale et leur extrémité C-terminale est cytosolique. Elles ne

possèdent qu'un segment transmembranaire suivi d'une courte queue cytoplasmique (11 acides aminés) contenant la séquence signal nécessaire à leur ciblage vers les lysosomes. Leur large domaine luminal contient de 16 à 20 sites de N-glycosylation ainsi que des sites de O-glycosylation. Cette glycosylation constitue environ 60 % de leur masse totale (Eskelinen et al., 2003). Cette forte glycosylation pourrait leur permettre d'échapper à l'action des hydrolases acides (Kundra et Kornfeld, 1999).

Leur rôle est encore mal défini. En effet, des souris déficientes en LAMP-1 sont viables et fertiles (Andrejewski et al., 1999). D'un point de vue morphologique, les lysosomes semblent tout à fait normaux et leurs propriétés, telles que l'activité spécifique de certaines hydrolases acides, le pH, la stabilité osmotique, la densité et leur distribution subcellulaire sont semblables à celles des souris contrôles. La diminution de l'expression de LAMP-1 semble compensée par une surexpression de LAMP-2. L'expression de LAMP-2 serait régulée au niveau de la traduction puisqu'elle n'est associée ni à une augmentation d'ARNm, ni à une augmentation de son temps de demi-vie (Andrejewski et al., 1999).

Pour les souris déficientes en LAMP-2, en revanche, la mortalité augmente entre le 20^{ème} et le 40^{ème} jour après la naissance (Tanaka et al., 2000). Les survivantes sont fertiles, ont une durée de vie presque normale mais sont de plus petite taille. Dans plusieurs tissus, une accumulation de vacuoles autophagiques est observable, notamment dans le muscle, le pancréas, le foie, le rein et le cœur. Ces souris présentent aussi une diminution de l'activité contractile du muscle cardiaque. Cette dernière manifestation correspond aux symptômes observés chez les patients atteints de la maladie de Danon, une glycogénose lysosomale sans déficit de maltase, liée à une mutation du gène codant pour LAMP-2 (Nishino et al., 2000), qui se caractérise par l'accumulation de matériel autophagique au niveau des myocytes striés.

Les souris KO pour cette protéine semblent donc constituer un bon modèle pour l'étude de cette maladie.

Ces souris présentent, au niveau du foie notamment, une augmentation des vacuoles autophagiques précoces et tardives (Tanaka et al., 2000). De plus, le recyclage du M6PR entre les endosomes et le Golgi est perturbé; entraînant ainsi un problème lors de l'adressage de certaines enzymes lysosomales qui sont alors envoyées dans le milieu extracellulaire. Cette erreur de ciblage a pour conséquence une capacité plus faible de dégradation des protéines à long temps de demi-vie (Eskelinen et al., 2002).

Il existe des souris double knockout pour LAMP-1 et LAMP-2 mais, celles-ci meurent au stade embryonnaire (Andrejewski et al., 1999).

B. Les LIMPs

Les protéines LIMP-1 (35-55 kDa) et LIMP-2 (60-85 kDa) sont moins abondantes que les LAMPs. Ce sont des protéines membranaires de type III. LIMP-1 traverse 4 fois la membrane lysosomale, tandis que LIMP-2 ne la traverse que deux fois (Eskelinen et al., 2003). Ces protéines sont aussi fortement glycosylées.

Une équipe japonaise a examiné les effets d'une surexpression de LIMP-2 sur la morphologie et sur le trafic membranaire du système endo-lysosomal (Kuronita et al., 2002). La surexpression de LIMP-2 provoque un élargissement des endosomes et des lysosomes. De telles altérations morphologiques ne sont pas observées par la surexpression d'autres protéines membranaires lysosomales telles que LAMP-1 et LAMP-2. Cette surexpression perturbe le trafic membranaire hors des compartiments endocytaires et provoque une

accumulation de cholestérol libre. L'expression d'une forme dominante négative de Rab 5 (une petite GTPase impliquée dans la fusion des endosomes précoces) a un effet inhibiteur sur la formation de ces larges vacuoles. LIMP-2 pourrait donc être impliquée dans la biogenèse des compartiments endo-lysosomaux, vraisemblablement à travers l'interaction avec une machinerie de régulation des mécanismes de fusion ou fission vésiculaire (Kuronita et al., 2002).

Le rôle de LIMP-2 dans la biogenèse des lysosomes est renforcé par le phénotype présenté par des souris knockout pour cette protéine. Les souris déficientes en LIMP-2 sont viables et fertiles mais elles montrent une série d'anomalies qui pourraient s'expliquer par des défauts dans les processus de transport membranaire dans la voie de l'endocytose (Eskelinen et al., 2003).

Ces découvertes concernant LAMP-2 et LIMP-2 semblent indiquer que ces protéines jouent un rôle non seulement structurel mais aussi fonctionnel.

➤ Les protéines « mineures » de la membrane

A côté des protéines LAMPs et LIMPs, il y a la pompe à protons et des protéines moins abondantes dont l'expression varie selon le type de cellule ou de tissu (Eskelinen et al., 2003). Parmi ces protéines, il faut citer les transporteurs membranaires, impliqués dans le transport de divers métabolites (acides aminés, mono- et oligosaccharides, oligopeptides). Leur existence a été mise en évidence par des expériences d'internalisation de métabolites radioactifs (Lloyd, 1996), grâce à des études menées sur les maladies de surcharge lysosomale (Havelaar et al., 1998; Town et al., 1998), ou encore par des études de protection osmotique. Par exemple, l'étude du transport de glucose à travers la membrane lysosomale a été réalisée selon cette dernière méthode (Jadot et al., 1989). Elle consiste à incuber les lysosomes dans une solution de glucose, provoquant l'éclatement de ces organites par choc osmotique. Si on ajoute un inhibiteur connu pour perturber le transport de glucose au niveau de la membrane plasmique (exemple : diéthylstilbestrol), et que cela empêche l'éclatement des organites, on peut en déduire la présence d'un transporteur de sucre au niveau de la membrane lysosomale.

A l'heure actuelle, la plupart des transporteurs lysosomaux n'ont pas encore été identifiés. La cystinosine et la sialine représentent des exceptions (voir plus loin).

A. Pompe à protons (V-type H⁺ ATPase)

Ce complexe protéique est responsable de l'acidification de la lumière lysosomale. Il est composé d'un domaine soluble V₁ formé de 8 sous-unités et d'un domaine transmembranaire V₀, formé de 5 sous-unités. Le domaine soluble a pour fonction l'hydrolyse de l'ATP alors que le domaine transmembranaire assure la translocation des protons (Forgac, 1999). Cette pompe établit un gradient électrochimique de protons. Celui-ci se révèle être une source d'énergie utile pour le transport de divers solutés au travers de la membrane (Van Dyke, 1996).

B. La cystinosine

La maladie de surcharge lysosomale, cystinose, est caractérisée par l'accumulation intralysosomale de cystine (forme disulfide de la cystéine). Elle est due à une mutation du gène (CTNS), qui code pour une protéine nommée cystinosine (Town et al., 1998). Son rôle consiste à transporter la cystine de la lumière des lysosomes vers le cytosol selon le gradient de protons (Kalatzis et al., 2001). La cystinosine est une protéine de 367 acides aminés

(Cherqui et al., 2001). Elle possède 7 segments transmembranaires et un domaine N-terminal fortement glycosylé. Sa queue C-terminale, composée de 10 acides aminés, renferme un motif d'adressage aux lysosomes (voir plus loin). Sa localisation lysosomale a été démontrée par immunofluorescence confocale (Cherqui et al., 2001).

C. La sialine

Sa découverte est aussi liée à l'étude d'une maladie de surcharge lysosomale, connue sous le nom de Maladie de Salla (Havelaar et al., 1998). Les patients atteints de cette pathologie possèdent une mutation dans le gène codant pour la sialine. La sialine possède 12 segments transmembranaires et ne contient ni de peptide signal, ni de séquence d'adressage aux lysosomes. Ce transporteur ne serait pas exclusivement localisé dans les lysosomes. En plus, la sialine a la particularité d'être non glycosylée (Havelaar et al., 1998). La sialine est un transporteur de fonction métabolique essentielle intervenant dans la sortie de l'acide sialique après dégradation des glycoprotéines, des glycosaminoglycans et des glycolipides (Havelaar et al., 1999).

D. Autres protéines

D'autres protéines membranaires lysosomales ont été identifiées (LAPTM4a, CLN3, etc...) mais leur rôle de transporteur n'a pas encore été clairement établi. Il est évident que, dans un bref avenir, la protéomique « subcellulaire », étude des protéines à partir de fractions subcellulaires purifiées (Brunet et al., 2003) devrait compléter la liste des protéines lysosomales connues.

1.3. BIOSYNTHESE ET TRANSPORT DES PROTEINES LYSOSOMALES

1.3.1. Biosynthèse et translocation

➤ **Protéines solubles**

La synthèse des enzymes lysosomales débute dans le cytoplasme par l'intermédiaire de ribosomes libres. Une fois que le peptide signal est traduit, il est reconnu par la particule de reconnaissance du signal (SRP pour *signal-recognition particle*). Cette liaison permet l'ancrage du nouveau complexe (chaîne polypeptidique naissante/ribosome/SRP) sur la membrane du réticulum endoplasmique (RE) grâce au récepteur de la SRP. La chaîne polypeptidique en formation est ensuite transférée dans un pore aqueux nommé translocon (Kornfeld et Mellman, 1989).

Le translocon est formé essentiellement d'un complexe protéique Sec61p. Sec61p contient 3 sous-unités (α , β , γ). L'association de plusieurs copies de Sec61p (3 ou 4) permet la formation d'un canal hydrophile d'un diamètre d'environ 20 Å (Hegde and Lingappa, 1997).

Après fixation du peptide signal sur le translocon, la traduction reprend et la chaîne polypeptidique qui s'allonge traverse la membrane et vient former une boucle dans la lumière du RE. Au cours de la translocation, un complexe protéique formé de 5 sous-unités (la signal peptidase) clive le peptide signal et libère ainsi la protéine naissante dans la lumière. Au même moment, un autre complexe protéique l'oligosaccharyl transférase (ou OST) ajoute des chaînes d'oligosaccharides sur certains résidus asparagine de la protéine naissante (Braulke,

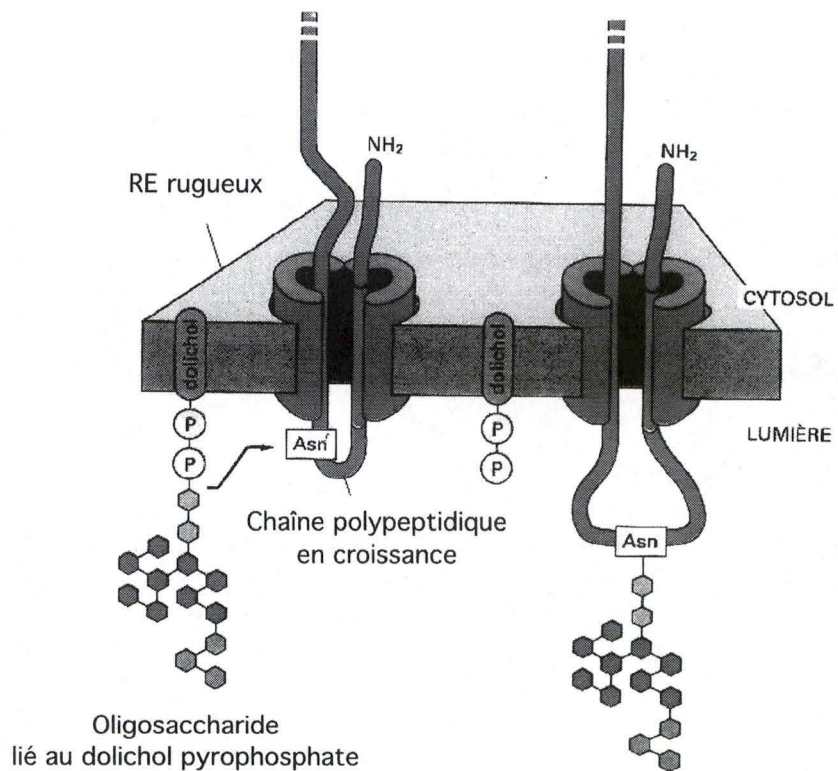


Figure 2 : Transfert d'une chaîne oligosaccharidique sur une asparagine au cours de la translocation à travers la membrane du réticulum endoplasmique (d'après Alberts et al., 1995).

1996). L'OST est formée de 3 sous-unités : 2 sous-unités membranaires et une sous-unité luminale qui contient le site actif de l'enzyme. L'OST transfère des oligosaccharides préformés ($\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNac}_2$) sur des résidus asparagine appartenant à une séquence consensus Asn-X-Ser/Thr (où X peut être n'importe quel acide aminé sauf la proline). Les molécules de $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNac}_2$ sont assemblées sur un transporteur lipidique de type polyisoprénoïde, le dolichol, qui est inséré dans la membrane du RE. La liaison entre le premier sucre (GlcNac) et le dolichol est une liaison hautement énergétique (liaison pyrophosphate). Elle fournit l'énergie nécessaire au transfert de l'oligosaccharide sur la chaîne latérale de l'asparagine (figure 2) (Braulke, 1996).

Dans la lumière du réticulum endoplasmique, des protéines appelées chaperonnes (BiP, calnexine, calréticuline, protéine disulfide isomérase...) interagissent éventuellement avec les protéines naissantes afin de les aider à trouver un repliement adéquat et un assemblage correct, nécessaires à leur fonction (Hegde and Lingappa, 1997).

➤ **Protéines membranaires**

Comme les protéines solubles, les protéines membranaires sont synthétisées sur les ribosomes et sont acheminées à la surface du RE suite à la liaison du complexe chaîne polypeptidique naissante/ribosome/SRP sur le récepteur membranaire de la SRP. Cependant, toutes les protéines membranaires ne possèdent pas de peptide signal à leur extrémité N-terminale. Dans ce cas, c'est le premier segment hydrophobe qui est reconnu par la particule SRP (Martoglio et al., 1995). Après cette étape d'ancrage à la membrane, la chaîne polypeptidique naissante traverse également la membrane par l'intermédiaire du translocon mais, contrairement aux protéines solubles, la translocation s'arrête avant la fin de la traduction (Hegde et Lingappa, 1997; High et Dobberstein, 1992).

A. Les protéines avec un seul segment transmembranaire

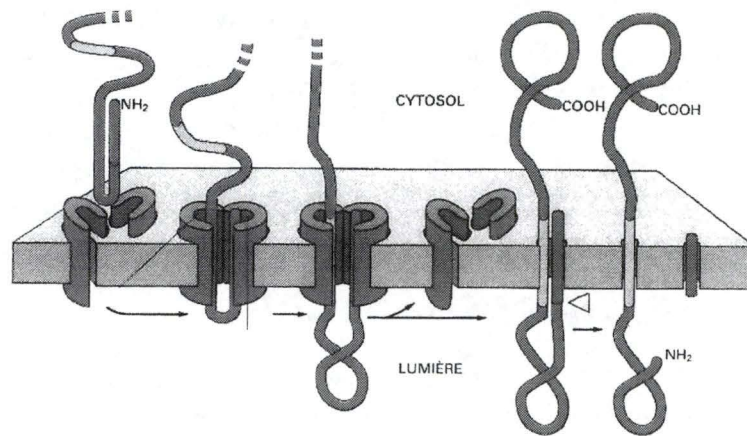
Les protéines membranaires de type I contiennent un peptide signal qui initie la translocation ainsi qu'un segment hydrophobe de 20-25 acides aminés qui arrête le processus de transfert avant la traduction complète de la protéine. Le translocon se referme et la partie C-terminale de la protéine se retrouve dans le cytosol après sa synthèse. Le peptide signal est clivé et le segment hydrophobe qui forme une hélice α se déplace latéralement entre les sous-unités du translocon avant de s'insérer dans la bicouche lipidique (Goder et Spiess, 2001).

Les protéines membranaires de type II et III ne possèdent pas de peptide signal en position N-terminale mais bien une séquence hydrophobe interne qui est reconnue par la SRP. Cette séquence n'est pas clivée. Au contraire, c'est elle qui va permettre l'ancrage de la protéine dans la membrane. L'orientation de cette séquence interne dans le translocon détermine l'orientation de la protéine entière. En règle générale, l'extrémité du peptide contenant le plus de charges positives se trouve du côté cytosolique. Lorsque l'extrémité amino-terminale se trouve du côté cytosolique, il s'agit d'une protéine de type II. Lorsqu'elle est du côté luminal, c'est une protéine de type III (Goder et Spiess, 2001).

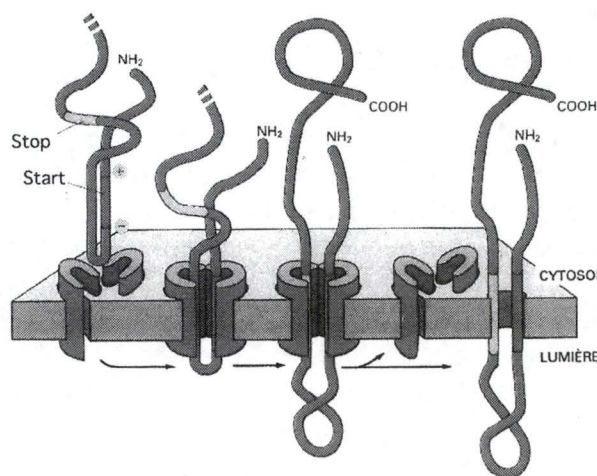
B. Les protéines polytopiques

Lorsque la protéine renferme plusieurs segments transmembranaires (protéines de type IV ou protéines polytopiques), c'est souvent le premier segment hydrophobe qui initie la translocation et le deuxième segment hydrophobe qui arrête la translocation. Les deux segments s'insèrent ensuite dans la bicouche lipidique avec des orientations opposées (figure

Avec 1 segment transmembranaire



Avec 2 segments transmembranaires



Figures 3: Translocation de protéines membranaires intégrales (avec un segment ou 2 segments transmembranaires) à travers la membrane du réticulum endoplasmique (d'après Alberts et al., 1995).

3, en bas). Le même processus se répète lorsque les 3^{ème} et 4^{ème} segments hydrophobes quittent le ribosome (Goder et Spiess, 2001; Hegde et Lingappa, 1997).

Selon un modèle simple, les hélices α s'inséreraient dans la membrane séquentiellement, au fur et à mesure de leur synthèse (Mothes et al., 1997). Dans ce cas, l'orientation de la protéine dépendrait uniquement du premier segment hydrophobe. Or, il est évident que d'autres éléments tels que le degré d'hydrophobicité des différents segments transmembranaires, la distance entre deux segments transmembranaires, la nature des acides aminés jouxtant un segment transmembranaire, influencent également l'insertion membranaire d'une protéine (Goder et Spiess, 2001). De plus, des études ont montré que le translocon était suffisamment élastique pour pouvoir accueillir simultanément plusieurs segments transmembranaires (Hegde et Lingappa, 1997). Dès lors, un deuxième modèle a été proposé. Il propose que plusieurs segments transmembranaires séjournent ensemble dans le translocon avant d'être transférés en bloc dans la bicouche (Borel et Simon, 1996). Cette cohabitation permettrait à la protéine polytopique d'adopter une structure particulière, nécessaire à sa fonction, en permettant notamment la mise en place d'interactions ioniques entre des acides aminés appartenant à des segments transmembranaires distants l'un de l'autre (Hegde et Lingappa, 1997).

1.3.2. Trafic intracellulaire des protéines lysosomales

➤ Protéines solubles

Il existe deux voies possibles pour cibler les hydrolases acides vers les lysosomes : soit un ciblage direct à partir du réseau trans-golgien (TGN), soit un transport passant par la membrane plasmique suivi d'une endocytose rapide (Braulke, 1996; Kornfeld et Mellman, 1989).

Dans le réticulum endoplasmique et dans le Golgi, les précurseurs des enzymes lysosomales subissent un certain nombre de modifications post-traductionnelles, notamment une modification de leurs chaînes oligosaccharidiques N-liées, dont l'addition d'un signal mannose-6-phosphate. Ce nouveau signal est reconnu par l'un des deux récepteurs au mannose-6 phosphate (M6PR). Cette interaction M6P-M6PR permet de séparer, au niveau du TGN, les protéines solubles destinées aux lysosomes des protéines destinées à la sécrétion. Les complexes hydrolases-M6PR sont ensuite acheminés vers les endosomes à l'intérieur de vésicules de transport, provenant du bourgeonnement du TGN. Dans les endosomes, le pH acide provoque la dissociation des récepteurs qui sont recyclés vers le TGN et des hydrolases qui gagnent les lysosomes par un mécanisme encore mal défini. Les hydrolases acides sont synthétisées sous une forme précurseur inactive et, suite à leur transport dans la voie endo-lysosomale, elles sont activées par clivage protéolytique (Kornfeld et Mellman, 1989).

Parallèlement à cette voie dépendante du M6P, il existerait une voie indépendante suggérée par l'observation de pathologies comme l'*I Cell Disease* et la *Pseudo-Hurler Polydystrophy*, où l'enzyme permettant la fixation du M6P sur les hydrolases (l'UDP- N-acétyl glucosamine-1-phosphotransférase) est déficiente (Kornfeld et Mellman, 1989; Neufeld et McKusik, 1983). En conséquence, la plupart des enzymes sont sécrétées au lieu d'être acheminées aux lysosomes. Pourtant, certaines d'entre elles (l' α -, la β - glucosidases et la cathepsine D) sont présentes en quantités normales (Neufeld et McKusik, 1983). Ces observations suggèrent l'existence d'une voie indépendante du M6P qui permettrait aux hydrolases d'atteindre

également les lysosomes. En effet, certaines protéines seraient capables de se lier de façon transitoire à des lipides membranaires et d'être ainsi dirigées à partir du TGN vers les lysosomes par une voie ne faisant pas intervenir le M6PR (Zhu et Conner, 1994).

Enfin, la phosphatase acide lysosomale (LAP) suit une voie indirecte, indépendante du M6P. Bien que la forme mature de LAP soit une protéine soluble, elle est synthétisée sous forme de protéine transmembranaire de type I. Cette forme précurseur passe par la membrane plasmique avant d'arriver aux lysosomes où le domaine transmembranaire et l'extrémité C-terminale sont clivés. Elle pourrait sortir du TGN par la voie de sécrétion constitutive (Hunziker et Geuze, 1996).

➤ Protéines membranaires

Les protéines membranaires possèdent, principalement dans leur domaine cytosolique, des séquences particulières (motifs ou signaux d'adressage) qui sont reconnus par des protéines adaptatrices (Bonifacino et Traub, 2003). Celles-ci permettent non seulement de concentrer les molécules cargo sur la face luminale mais aussi d'organiser les monomères de clathrine sur la face cytoplasmique du RE (Robinson et Bonifacino, 2001).

A. Les motifs d'adressage aux lysosomes

La plupart de ces signaux sont de courtes séquences linéaires d'acides aminés. Ces séquences ne sont pas totalement conservées, il s'agit plutôt de motifs dégénérés de 4 à 7 résidus dont 2 à 3 sont critiques pour le ciblage (Bonifacino et Traub, 2003).

Il existe deux motifs principaux pour le ciblage des protéines vers les lysosomes : les motifs basés sur la tyrosine (YXX ϕ ou GYXX ϕ où X correspond à n'importe quel AA et ϕ est un AA hydrophobe) (Canfield et al., 1991; Jadot et al., 1992; Trowbridge et al., 1993) et les motifs contenant une dileucine ([DE]XXXL[LI] ou DXXLL) (Johnson et Kornfeld, 1992).

Les glycoprotéines membranaires LAMP-1, LAMP-2 et LIMP-1 ainsi que les deux M6PR possèdent un motif YXX ϕ dans leur séquence C-terminale. Le résidu tyrosine et le résidu hydrophobe sont essentiels pour l'adressage aux lysosomes. En effet, la substitution de la tyrosine ou de l'isoleucine dans le motif GYQTI de LAMP-1 provoque une redistribution complète de LAMP-1 à la surface cellulaire (Guarnieri et al., 1993). De même, la substitution de la tyrosine perturbe l'internalisation du M6PR cation-indépendant (Jadot et al., 1992). LIMP-2, par contre, possède un motif dileucine de type [DE]XXXL[LI]. La substitution d'une de ces 2 leucines supprime toute activité de ce signal. De même, la présence d'un résidu acide en position -4 de la première leucine semble importante pour le ciblage aux lysosomes. Dans certains cas, le domaine cytosolique de la protéine renferme deux motifs différents. Par exemple, les M6PR possèdent un motif GYXX ϕ ainsi qu'un motif dileucine (Johnson et Kornfeld, 1992). Dans le cas du M6PR cation-indépendant, le motif tyrosine est celui qui permet une internalisation rapide du récepteur au niveau de la membrane plasmique, induisant ainsi l'endocytose d'enzymes lysosomales extra-cellulaires (Canfield et al., 1991). Le motif di-leucine, quant à lui, permet l'interaction du récepteur avec les protéines adaptatrices du Golgi (Johnson et Kornfeld, 1992).

Des études réalisées sur la cystinosine montrent qu'un motif d'adressage aux lysosomes peut également se situer dans une boucle cytosolique et pas uniquement à l'extrémité C-terminale de la protéine (Cherqui et al., 2001). En effet, la cystinosine contient un motif GYXX ϕ dans son extrémité C-terminale. Cependant, la délétion de ce motif ne provoque qu'une

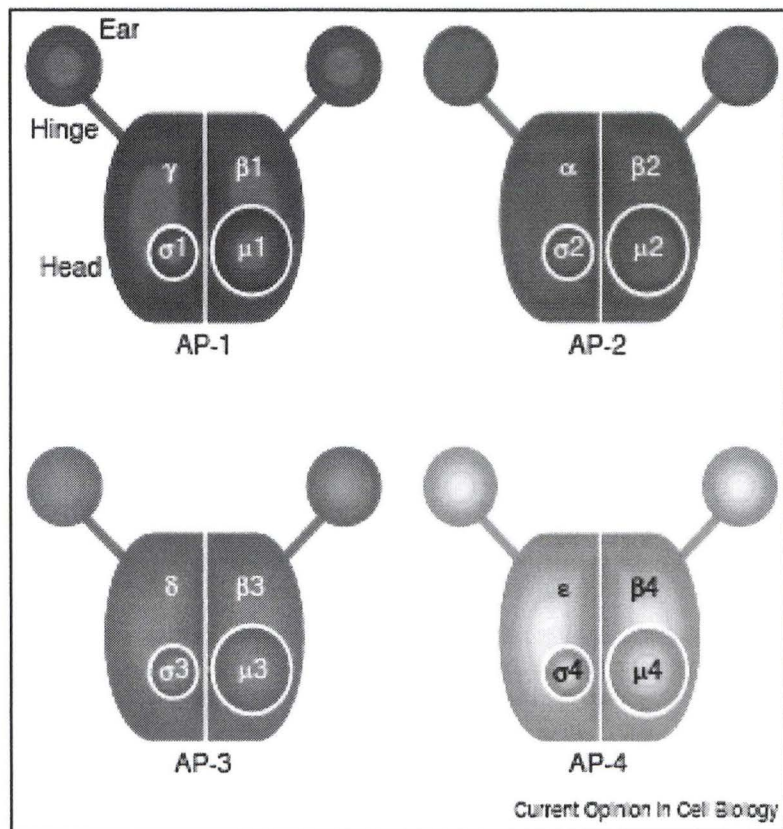


Figure 4 : Représentation schématique des protéines adaptatrices (APs)

Chaque complexe est formé de 2 grandes sous-unités : une sous-unité β et une sous-unité plus variable (γ , α , δ ou ϵ) ; une sous-unité moyenne (μ) et d'une petite sous-unité (σ) (d'après Robinson & Bonifacino, 2001).

redistribution partielle de la protéine vers la membrane plasmique. Par contre, lorsqu'ils enlèvent en plus de ce motif GYXX ϕ , une boucle cytosolique interne, la protéine se retrouve exclusivement à la surface cellulaire. Ce résultat démontre l'existence dans la séquence primaire de la cystinosine d'un second motif d'adressage aux lysosomes, différent de ceux connus actuellement (Cherqui et al., 2001).

Tout comme les signaux YXX ϕ , les motifs [DE]XXXL[LI] permettent également une rapide internalisation et un adressage des protéines de la membrane plasmique vers les compartiments endo-lysosomaux, suggérant que ces signaux peuvent être reconnus aussi bien à la surface cellulaire que dans des compartiments subcellulaires, comme le TGN et les endosomes (Bonifacino et Traub, 2003). Par exemple, le précurseur membranaire de la phosphatase acide lysosomale (LAP) qui passe par la membrane plasmique avant d'arriver aux lysosomes, renferme dans sa queue cytosolique un motif GYXX qui pourrait lui permettre d'arriver aux endo-lysosomes par endocytose rapide (Hunziker et Geuze, 1996).

B. Les protéines adaptatrices

Le transport des protéines, via des vésicules de transport implique toute une série de facteurs cytosoliques et de signaux. Parmi les protéines importantes régulant de trafic vésiculaire se trouvent les protéines adaptatrices (AP) qui forment des complexes hétérotétramériques (Boehm et Bonifacino, 2002; Nakatsu et Ohno, 2003). Ces protéines jouent un rôle dans la formation des vésicules de transport et dans la sélection des molécules à transporter. Il existe 4 types de complexes AP: AP-1, AP-2, AP-3 et AP-4 (figure 4). AP-1 et AP-3 possèdent des isoformes A et B. AP-1B et AP-3B sont exprimés respectivement dans les cellules épithéliales et dans les neurones. Tous les autres AP sont ubiquistes (Nakatsu et Ohno, 2003).

Chacun des complexes est composé de 4 sous-unités différentes: 2 grandes (γ/β_1 , α/β_2 , δ/β_3 , ϵ/β_4), une moyenne (μ_{1-4}) et une plus petite (σ_{1-4}). Les sous-unités γ , α , δ , ϵ permettent la liaison aux membranes cibles tandis que les β (sauf β_4) recrutent la clathrine grâce à une séquence de liaison à la clathrine. Les sous-unités moyennes (μ_{1-4}) sont responsables dans la sélection des protéines cargo. Elles reconnaissent les motifs tyrosine (pour tous) et les motifs dileucine (tous sauf μ_4) se trouvant dans la queue cytoplasmique des molécules cargo. Les sous-unités σ semblent impliquées dans la stabilisation du complexe (figure 4). Ces complexes participent à divers événements de ciblage (Boehm et Bonifacino, 2002).

AP-2 semble être presque exclusivement localisé sur la membrane plasmique, au niveau des puits et des vésicules recouverts de clathrine (Boehm et Bonifacino, 2002). Ce complexe interagit avec des signaux d'internalisation présents dans la queue cytoplasmique des récepteurs destinés à l'endocytose. Il pourrait participer à l'endocytose des M6PR (Glickman et al., 1989) et des protéines lysosomales qui arrivent aux lysosomes en passant par la membrane plasmique (Mullins et Bonifacino, 2001).

AP-3 est localisé au niveau du TGN et au niveau d'un compartiment plus périphérique, probablement les endosomes. Des patients avec des mutations dans le gène β_3A et donc déficients en AP-3, présentent des défauts dans les lysosomes et dans des organites semblables aux lysosomes, en particulier les mélanosomes et les granules denses des plaquettes sanguines. Cependant, le rôle dans le trafic intracellulaire des protéines lysosomales n'est pas clair. En effet, dans les cellules déficientes en AP-3, certaines protéines membranaires lysosomales (comme LAMP-1, LAMP-2 et LIMP-2) transitent plus

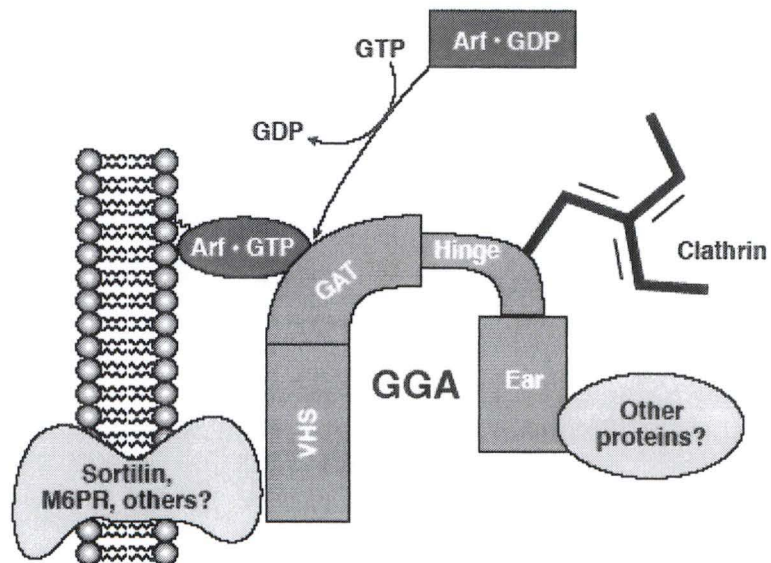


Figure 5. Modèle d'interactions des GGAs avec d'autres protéines telles que la clathrine, Arf et le récepteur mannose-6 phosphate (d'après Boman, A.L., 2001)

régulièrement par la membrane plasmique mais à l'état d'équilibre, elles restent préférentiellement associées aux lysosomes (Boehm et Bonifacino, 2002).

AP-4 est localisé principalement au niveau du TGN mais il est peu abondant dans la plupart des cellules. Le recrutement membranaire de AP-4, comme celui de AP-1 et de AP-3, est régulé par une petite GTPase, membre de la famille des ARF (*ADP-ribosylation factor*). Cependant, AP-4 ne se trouverait pas dans des vésicules recouvertes de clathrine. Son rôle dans l'adressage des protéines lysosomales reste à démontrer (Boehm et Bonifacino, 2002).

On a longtemps supposé que AP-1, en interagissant avec les motifs tyrosine, permettait le transport des M6PRs et des protéines lysosomales membranaires à partir du TGN vers les endosomes (Mullins et Bonifacino, 2001). Cependant, l'inhibition de la sous-unité μ_1 de AP-1 entraîne une accumulation des M6PRs dans les endosomes plutôt que dans le TGN. De plus, les protéines membranaires sont toujours transportées vers les lysosomes (Meyer et al., 2000). Cette découverte suggère que AP-1 joue un rôle dans le recyclage des M6PRs à partir des endosomes vers le TGN plutôt que dans le transport antérograde des protéines lysosomales (Mullins et Bonifacino, 2001). Par la suite, il a été démontré que c'était le motif dileucine présent dans la séquence du M6PR qui assurait le transport des enzymes lysosomales du TGN vers les endosomes (Johnson et Kornfeld, 1992). Comme AP-1 ne semble pas se fixer sur le motif dileucine, d'autres protéines adaptatrices devaient remplir ce rôle.

Récemment, une nouvelle famille de protéines, les GGAs (*Golgi-localizing, γ adaptatin ear homology domain, ARF-binding*) ont été identifiées (Robinson et Bonifacino, 2001). Ces protéines monomériques sont composées d'un domaine VHS amino-terminal, d'un domaine GAT, d'une région charnière de taille variable et d'un domaine GAE carboxy-terminal qui présente des homologies avec la sous-unité γ de AP-1 (figure 5). Tout comme AP-1, les GGAs sont recrutées sur la membrane du TGN par l'intermédiaire des protéines ARF activées. Le domaine VHS des protéines GGAs reconnaît le motif dileucine, précédé de quelques acides aminés chargés négativement, présent dans la queue cytoplasmique des récepteurs du M6P (Bonifacino et Traub, 2003; Robinson et Bonifacino, 2001). Le domaine GAT lui, lie les protéines ARF activées et est responsable de la localisation membranaire des GGAs. Quant à la région charnière, la moins conservée, elle contient des domaines de liaison à la clathrine. Les GGAs lient également des protéines accessoires par leur domaine GAE carboxy-terminal (Robinson et Bonifacino, 2001).

2. ÉTUDES PROTÉOMIQUES DES ORGANITES SUBCELLULAIRES

Les développements techniques et méthodologiques de ces dernières années ont mis à la disposition des chercheurs des outils (gels d'électrophorèse en 2 dimensions, spectrométrie de masse, bioinformatique) extrêmement puissants pour la caractérisation des protéines. Les analyses qui en découlent peuvent s'appliquer à de nombreux domaines tels que la biologie, la médecine et l'agriculture.

2.1. GÉNÉRALITÉS

La protéomique est l'étude du protéome qui se définit comme l'ensemble des protéines encodées par le génome.

Les approches de type protéomique rassemblent l'ensemble des travaux visant à caractériser à grande échelle des protéines, que ce soit par leur identification spécifique ou par l'étude de leur niveau d'expression, de leurs modifications post-traductionnelles ou encore des interactions entre elles. Un des buts majeurs de la protéomique est d'obtenir une vision globale et précise du rôle de l'ensemble des protéines dans les mécanismes cellulaires (Brunet et al., 2003).

Il existe 2 sortes d'approche protéomique : l'approche protéomique différentielle et la cartographie du protéome cellulaire (Boussac, 2001).

La première permet la comparaison de l'expression des protéines entre les différents tissus ou lignées cellulaires. Cette approche permet aussi de comparer la réponse cellulaire face à un stress ou une stimulation d'une lignée cellulaire. Cette technique est essentielle pour les études de pathologies. En effet, en comparant des individus sains et malades, on peut découvrir de nouveaux marqueurs pour les différentes maladies.

La seconde permet de caractériser le protéome cellulaire et de déterminer les différents partenaires interagissant avec ses constituants, en vue de la recherche de leur fonction et de leur localisation.

Le système cellulaire, pris en entier, est très complexe. Cela vient en partie du fait que de nombreux gènes codants subissent des épissages alternatifs donnant lieu à une quantité énorme de transcrits et donc de protéines. Ces dernières peuvent encore subir diverses modifications co- et post-traductionnelles et aboutir à plusieurs isoformes.

Du coup, lors des analyses protéomiques à grande échelle, les protéines de faible abondance se trouveraient masquées par celles fortement exprimées (Brunet et al., 2003).

Il est donc nécessaire de focaliser son attention sur un système de protéines déterminé. C'est pourquoi, de plus en plus, on étudie une fraction du protéome en partant d'un complexe protéique particulier ou d'une structure subcellulaire particulière (comme les organites) plus ou moins purifié.

La purification des complexes protéiques peut se faire par des techniques d'extraction avec des détergents ou par différentes méthodes d'affinité (substrats, anticorps spécifiques, ...). Ensuite, les protéines co-purifiées sont séparées par électrophorèse et puis identifiées par spectrométrie de masse (Boussac, 2001). Quant à la purification des organites subcellulaires, elle nécessite différentes techniques de fractionnement à partir d'un homogénat cellulaire. Malheureusement, il existe toujours un risque de contamination par d'autres compartiments cellulaires. Dès lors, il est indispensable de vérifier la localisation subcellulaire des protéines nouvellement identifiées (par exemple par microscopie confocale) avant d'étudier leur

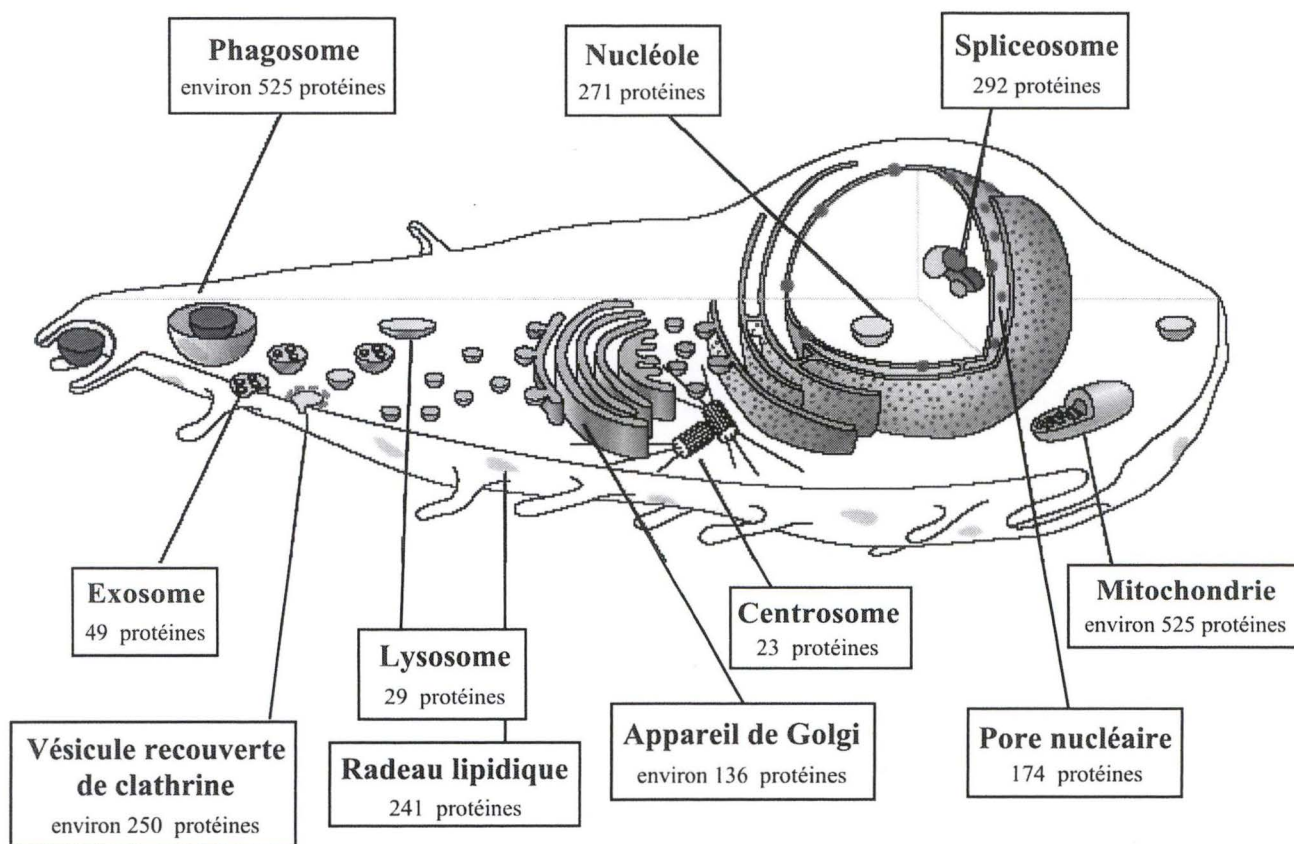


Figure 6 : Carte cellulaire

Etat des lieux des protéines identifiées par des études de protéomique subcellulaire visant à comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation de la fonction de différents organites cellulaires (d'après Brunet et al., 2003).

fonction. Il est clair cependant que cette approche permet d'identifier un grand nombre de protéines et permet donc d'avoir une idée plus globale et précise d'un organite donné (Brunet et al., 2003; Taylor et al., 2003a) (figure 6).

2.2. PROTÉOMIQUE DES ORGANITES

Nous n'allons pas présenter ici une liste exhaustive de toutes les protéines découvertes à ce jour par des études de protéomique subcellulaire. La liste évolue tellement vite que nous allons simplement présenter quelques exemples.

2.2.1. Le noyau

Le noyau peut être divisé en plusieurs composants pouvant chacun subir une analyse protéomique.

L'enveloppe nucléaire est une structure contenant 2 membranes en continuité avec celle du réticulum endoplasmique et qui est perforée à divers endroits par des pores riches en protéines.

A partir de noyaux, obtenus par fractionnement, il est possible d'isoler des protéines dérivant des diverses parties de l'enveloppe nucléaire en utilisant différentes techniques d'extractions (Dreger et al., 2001). L'analyse par spectrométrie de masse de ces échantillons a permis l'identification de 148 protéines dont 19 étaient encore inconnues ou non caractérisées. Par la suite, la localisation au niveau de la membrane nucléaire interne de deux de ces nouvelles protéines a été confirmée par immunofluorescence confocale (Dreger et al., 2001).

Les pores nucléaires situés dans l'enveloppe nucléaire et contrôlant le trafic des molécules entre le noyau et le cytoplasme, ont aussi été analysés par la protéomique classique. Sur les protéines identifiées à partir de pores nucléaires purifiés à partir de foie de rat, 29 protéines ont été classifiées comme porines et 18 comme protéines associées à ces complexes (Taylor et al., 2003a). Parmi les 29 nucléoporines, 6 n'avaient jamais été découvertes et une nouvelle famille de porine a ainsi été caractérisée.

Le nucléole se définit comme le site de synthèse et d'assemblage des ARN ribosomiaux. En combinant l'utilisation de la spectrométrie de masse et l'utilisation de banques de données, 271 protéines ont été identifiées (Brunet et al., 2003). Environ 30 % de ces protéines n'étaient pas connues et l'expression de ces protéines étiquetées a confirmé la localisation nucléaire pour 18 d'entre elles.

Le spliceosome, responsable du remaniement des transcrits par épissage alternatif à lui aussi été soumis à une analyse par spectrométrie de masse (Taylor et al., 2003a). Dans l'étude menée par Neubauer et son équipe, les spliceosomes ont été purifiés sur colonne d'avidine en utilisant comme appât de l'ARN biotinylé. Les protéines appartenant au complexe ont ensuite été séparées par électrophorèse à une dimension et puis analysées par spectrométrie de masse. 311 protéines ont été identifiées. Parmi elles, se retrouvent 96 nouvelles protéines.

2.2.2. Les mitochondries

Les mitochondries fournissent 80 à 90 % de l'ATP nécessaire aux cellules des tissus respiratoires. Elles interviennent dans de nombreux processus physiologiques tels que la mort cellulaire, le contrôle de la balance ionique, et dans le métabolisme des hydrates de carbones

et des acides gras. Il existerait au moins 1500 protéines mitochondriales, leur permettant d'assumer leurs différentes fonctions.

Une étude réalisée sur *Arabidopsis thaliana* a permis l'identification de 800 protéines mitochondriales (Taylor et al., 2003a). Cependant, vu la technique utilisée, les gels 2D, il se pourrait que ce nombre soit sous-estimé puisque les gels 2D excluent un certain nombre de protéines agrégées dans la dimension isoélectrique de cette analyse. De plus, les protéines faiblement exprimées peuvent aussi être masquées par celles fortement exprimées.

Taylor et ses collaborateurs (Taylor et al., 2003b) ont utilisé une approche alternative dans le but de déterminer le protéome mitochondrial. Cette équipe a obtenu des fractions hautement purifiées de mitochondries en utilisant des centrifugations sur gradients de metrizamide afin d'enlever les protéines cytosoliques et les autres contaminants subcellulaires. Ensuite, ils ont séparé les complexes mitochondriaux en utilisant une centrifugation sur gradient de densité de saccharose après solubilisation dans un détergent doux (n-dodécyl- β -D-maltoside). Les protéines de chaque complexe ont été séparées par électrophorèse à une dimension et puis analysées par spectrométrie de masse. Ainsi, 615 protéines ont été identifiées, protéines provenant de toutes les gammes de pI, de PM et d'hydrophobicité. Une portion significative de ces protéines est impliquée dans la signalisation, la synthèse de l'ARN, de l'ADN et des protéines ainsi que dans le transport des ions et le métabolisme des lipides (Taylor et al., 2003b).

Une approche génétique élégante a été développée par l'équipe d'Umezawa. Elle permettrait d'identifier à large échelle de nouvelles protéines mitochondriales à partir d'une banque d'ADNc (Ozawa et al., 2003). Leur approche est basée sur la reconstitution d'une protéine GFP, divisée en 2, dans les mitochondries. Des séquences de la banque d'ADNc sont fusionnées au hasard avec la moitié N-terminale de la GFP. Si la protéine de fusion qui est exprimée contient l'information d'adressage à la matrice mitochondriale, la moitié de la GFP entrera en contact avec son partenaire C-terminal. La GFP entière est reconstituée dans la matrice par un élément d'épissage protéique, présent dans les deux protéines « reporter ». Cette technique a l'avantage que seuls les clones positifs produisent un signal fluorescent que l'on peut isoler par FACS. Les gènes intéressants sont identifiés par la suite par des techniques de génétique moléculaire. Ce système n'a pas encore été appliqué mais pourrait à l'avenir, se révéler être une technique très performante (Ozawa et al., 2003).

2.2.3. L'appareil de Golgi

Le Golgi joue un rôle crucial dans les modifications post-traductionnelles que subissent les protéines ainsi que dans l'adressage de ces protéines et lipides vers leurs diverses destinations. Le nombre de protéines golgiennes est estimé à environ 1000, or moins de 200 sont connues à l'heure actuelle. La majorité des études protéomiques sur l'appareil de Golgi vise particulièrement la caractérisation de sa membrane.

Une étude a été réalisée à partir de fractions enrichies en Golgi, soumises à une partition dans le Triton X-114 afin de récupérer les protéines membranaires (Bell et al., 2001). Les protéines ont ensuite été séparées dans un gel 1 D et analysées par un couplage de la méthode de séquençage d'Edman et de la spectrométrie de masse. Sur 81 protéines identifiées, 49 étaient transmembranaires. La majorité de ces protéines étaient des protéines résidentes du Golgi, ainsi que des protéines impliquées dans le trafic cellulaire. Une nouvelle protéine de 34 kDa associée aux membranes golgiennes a été mise en évidence. Sa localisation a été vérifiée par immunolocalisation.

2.2.4. Les endosomes

La voie endocytaire est une voie étudiée par un grand nombre de chercheurs. Cependant, peu d'études protéomiques ont pu être réalisées sur les différents types d'endosomes, en raison du manque de protocoles d'isolement efficaces. Toutefois, un certain nombre d'informations ont pu être rassemblées notamment sur les vésicules recouvertes de clathrine (Brunet et al., 2003). Ces vésicules ont été isolées par une méthode de fractionnement subcellulaire sur gradient de densité de saccharose puis séparées sur un gel à une dimension et analysées par spectrométrie de masse. Environ 250 protéines ont été identifiées, 10 d'entre elles étaient encore inconnues.

Une étude réalisée sur des phagosomes, contenant des billes de latex et obtenus par une technique de flotation, a permis d'identifier plus de 140 protéines dont certaines étaient encore inconnues ou non décrites au niveau de cet organite (Garin et al., 2001). Parmi ces protéines, il y a des hydrolases, des sous-unités de la pompe à protons et des protéines appartenant à la machinerie de fusion membranaire. Remarquablement, un nombre important des protéines identifiées étaient des protéines appartenant au réticulum endoplasmique. Leur localisation au niveau du phagosome a été confirmée par différentes approches comme les analyses en Western Blot, et la localisation par immunofluorescence. Cette étude a apporté de nouvelles connaissances sur le fonctionnement et la biogenèse des phagosomes (Garin et al., 2001).

Une population particulière de vésicules a été identifiée, il s'agit des exosomes. Les exosomes sont des vésicules de recyclage situées dans les corps multivésiculaires. Ces derniers sont capables de libérer leur contenu, dont les exosomes, dans le milieu extracellulaire. Les fonctions biologiques des exosomes sont encore mal comprises et la caractérisation de leur protéome devrait permettre de mieux les comprendre. L'étude menée par M. Boussac, a permis l'identification de 33 protéines dans les exosomes de cellules dendritiques de souris (Boussac, 2001). Une étude similaire a été menée sur des cellules dendritiques humaines, et a permis l'identification de 29 protéines dont 19 possèdent leur homologue chez la souris. Ces identifications ont permis d'apporter des informations sur leur biogenèse et leurs mécanismes d'actions.

2.2.5. Les lysosomes

L'isolement de populations de lysosomes par centrifugation a permis d'associer rapidement toute une variété d'hydrolases acides à ce compartiment subcellulaire, mais l'identification des protéines membranaires fut beaucoup plus tardive.

L'important pour toute analyse protéomique est d'obtenir des lysosomes avec un minimum de contaminants (ceci est valable aussi pour les autres organites) provenant des autres compartiments, tout en conservant des quantités suffisantes pour pouvoir identifier des protéines minoritaires ou membranaires.

➤ Purification des lysosomes

Trois méthodes différentes de purification permettent d'avoir des échantillons de très bonne qualité :

- La technique « classique » de sédimentation différentielle couplée à une centrifugation isopycnique sur gradients discontinus de Nycodenz, à partir d'un homogénat de foie de rat (Wattiaux et al., 1978).
- L'électrophorèse en flux continu (FFE : Free-Flow Electrophoresis). Cette technique permet de séparer les organites subcellulaires en fonction de leur charge électrique globale. Sachant que les lysosomes et les endosomes possèdent une forte charge négative, il est possible de les séparer des autres organites par cette technique (Marsh, 1989).
- La technique des tritosomes développée par R. Wattiaux qui consiste à injecter un détergent non ionique, le Triton WR 1339, à un rat (Wattiaux et al., 1963). Le Triton s'accumule alors dans les lysosomes, ce qui provoque leur allègement et facilite leur purification dans un gradient de densité de saccharose.

➤ Etude protéomique des hydrolases acides

Le Professeur P. Lobel, avec qui notre laboratoire collabore, a eu l'idée originale de sélectionner les hydrolases acides, provenant de lysosomes, en se basant sur la présence du signal M6P dans les formes précurseurs de la plupart de ces enzymes solubles. La technique comporte 3 étapes. La première sert à solubiliser les protéines en ajoutant un détergent (Triton X-100) sur une fraction enrichie en lysosomes. La deuxième consiste à purifier les hydrolases solubles par chromatographie d'affinité à l'aide de récepteurs au M6P greffés à la colonne. Ensuite, les protéines éluées de la colonne avec un excès de M6P, sont séparées par électrophorèse 2D et analysées par spectrométrie de masse (Sleat et al., 1996).

Le laboratoire du Professeur Garin, à Grenoble, utilise une technique similaire pour analyser les hydrolases acides contenant le signal M6P (Journet et al., 2002). Cette équipe a purifié des protéines à M6P à partir du surnageant de cellules déficientes en M6PR : ces cellules sécrètent donc une grande partie de leurs protéines M6P dans le milieu extracellulaire. Celles-ci ont ensuite été purifiées sur une colonne d'affinité, puis séparées par gel 2D et enfin analysées par spectrométrie de masse. 22 protéines ont été identifiées : 16 correspondaient à des constituants lysosomaux connus, 3 étaient de nouvelles hydrolases et les 3 dernières ont été identifiées comme étant non lysosomales.

➤ Etude protéomique des protéines membranaires

Une étude récente menée dans le laboratoire du Pr. Garin avec qui nous travaillons également en étroite collaboration, a été réalisée à partir de lysosomes purifiés dans notre laboratoire (Boussac, 2001). Le but est de mettre en évidence de nouvelles protéines de la membrane lysosomale. Les protéines membranaires sont plus difficiles à analyser par électrophorèse 2D parce qu'elles ont tendance à s'agréger et à précipiter dans la première dimension. Il existe actuellement des détergents qui empêchent la reformation d'interactions hydrophobes et la précipitation des protéines membranaires après solubilisation mais l'étude protéomique des protéines membranaires reste malgré tout un problème délicat (Garin et al., 2001).

Au cours de cette étude, les protéines membranaires des lysosomes ont été concentrées par centrifugation des membranes après extraction des protéines solubles par choc hypotonique. Les protéines ont ensuite été extraites séquentiellement dans du Triton X-100 et dans des

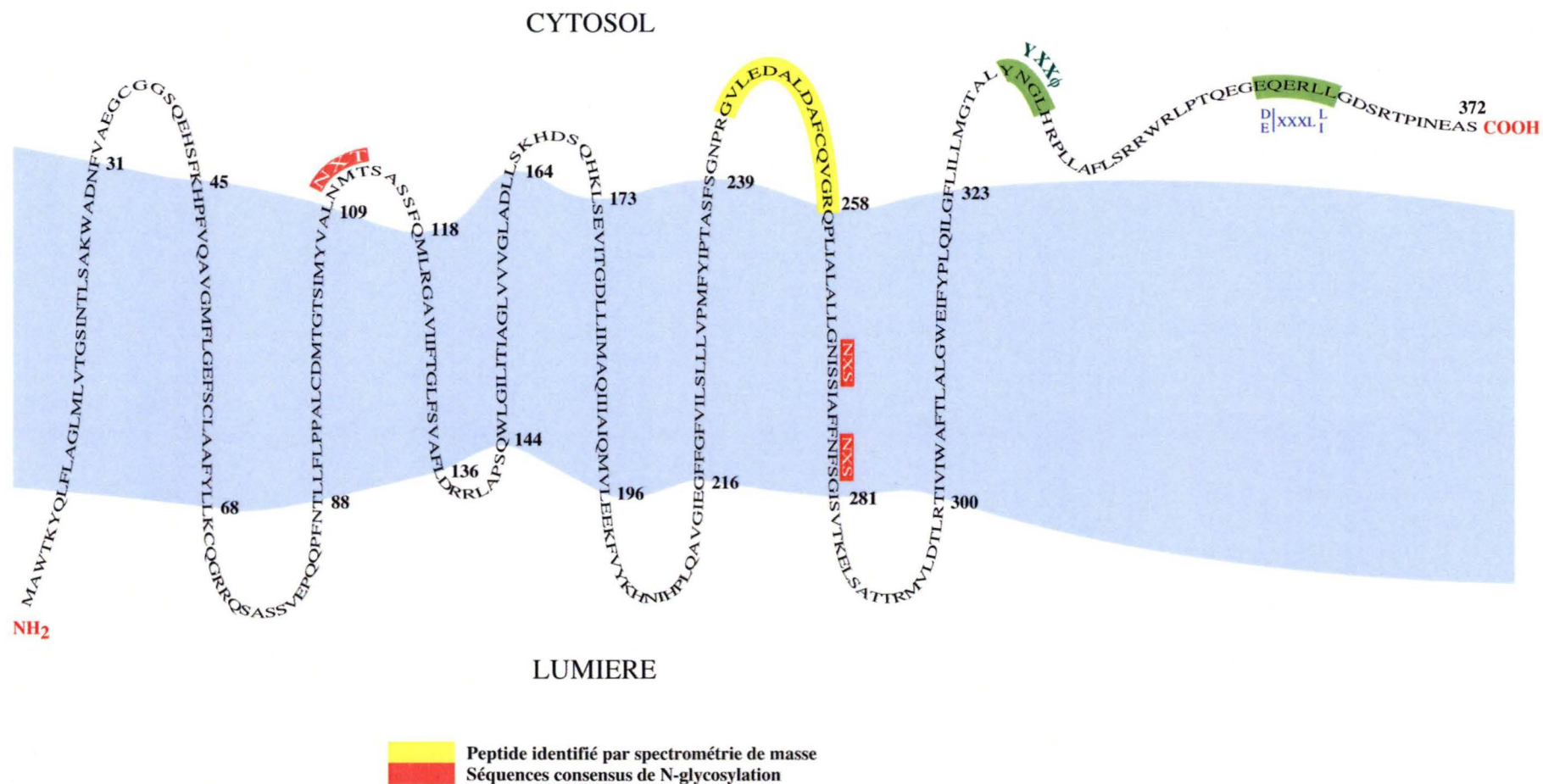


Figure 7 : Topologie membranaire de p40 selon le modèle de prédiction proposé par le logiciel TMHMM2 (<http://www.cbs.dtu.dk>)

solvants organiques (mélange chloroforme/méthanol) afin de sélectionner les protéines les plus hydrophobes. L'analyse par une technique couplant la chromatographie liquide à la spectrométrie de masse en tandem (nano-LC MS/MS) a permis d'identifier une vingtaine de protéines lysosomales présumées sur base de 52 peptides (Boussac, 2001). Ce travail est toujours en cours actuellement (Garin, résultats non publiés).

3. OBJECTIFS DE TRAVAIL

Parmi la vingtaine de protéine découverte lors de l'étude protéomique menée par le laboratoire du Professeur Garin (voir paragraphe précédent) se trouve une protéine totalement inconnue nommée p40 car sa masse moléculaire théorique est d'environ 40 kDa. Des recherches d'homologies de séquence avec le logiciel BLAST, n'ont pas permis de déterminer la fonction de p40. Cependant, elles ont montré que p40 avait une faible homologie avec des transporteurs d'UDP-galactose et d'UDP-N-acétylglucosamine du Golgi. P40 pourrait donc être un transporteur du même type mais localisé dans les lysosomes. Actuellement, dans le cadre de sa thèse doctorale, Marielle Boonen étudie la localisation intracellulaire de p40 dans des cellules de mammifères transfectées avec l'ADN complémentaire (ADNc) de p40. Pour cela, elle réalise des expériences de colocalisation par microscopie immunofluorescente confocale à l'aide d'anticorps spécifiques. Pour ma part, au cours de mon mémoire, je me suis intéressée à la caractérisation de p40 dans un système de traduction *in vitro*. Mis ensemble, nos résultats devraient nous permettre de rassembler des informations utiles concernant sa topologie, sa biosynthèse, sa localisation et peut-être même, sa fonction ou ses fonctions.

P40 possède 372 acides aminés dont la moitié sont hydrophobes. Des analyses *in silico* de sa séquence suggèrent la présence de 3 sites potentiels de glycosylation et de nombreux segments transmembranaires (probablement 9). Quatre motifs d'adressage aux lysosomes ont été découverts au niveau de sa séquence primaire: il s'agit de trois motifs tyrosine (YXX ϕ) suivis d'un motif dileucine. Deux des motifs tyrosine se trouvent dans ou à la limite d'un segment transmembranaire potentiel. Les deux autres sont présents à l'extrémité C-terminale de la protéine.

La topologie membranaire de p40 (c'est-à-dire le nombre exact de segments transmembranaires et leur orientation par rapport à la bicouche lipidique) n'est pas connue. Si les prédictions sont correctes, p40 renfermerait un nombre impair de segments transmembranaires. Autrement dit, les extrémités N-et C-terminales se trouveraient de part et d'autre de la membrane. De plus, comme les motifs d'adressage aux lysosomes se situent généralement dans la queue cytosolique des protéines membranaires, nous postulons que la topologie membranaire de p40 est celle décrite à la figure 7. Au cours de mon mémoire, nous avons suivi différentes approches pour sonder la véracité de ce modèle. Pour cela, nous avons utilisé un système de traduction *in vitro* composé de lysats de réticulocytes et de microsomes. Ce système contient tous les facteurs nécessaires à la traduction : ribosomes, ARN de transfert, acides aminés, SRP, source énergétique. Il est souvent utilisé pour étudier les modifications co-traductionnelles (comme la glycosylation ou le clivage du peptide signal) ainsi que l'insertion membranaire des protéines néo-synthétisées (Borel et Simon, 1996; Gilmore et al., 1991; Perara et Lingappa, 1985; Skach et al., 1994; Tector et Hartl, 1999). Ce système de traduction acellulaire présente plusieurs avantages : inutile de maintenir des cellules en culture, de les transfecter, d'attendre 24 ou 48 h avant de les utiliser et de faire des marquages métaboliques avant de séparer les protéines sur gel d'acrylamide. C'est donc un gain de temps considérable. De plus, la quantité de protéines exprimées est telle qu'il n'est pas nécessaire de les concentrer par (immuno) précipitation avant de réaliser l'électrophorèse.

Ce n'est pas le cas avec les cellules en culture. Pour toutes ces raisons, le système de traduction *in vitro* représente un outil de choix pour étudier la la topologie membranaire d'une protéine inconnue.

MATERIEL ET METHODES

1. OBTENTION DE MUTANTS PAR BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

Pour la construction des mutants de p40, nous avons suivi des protocoles classiques en biologie moléculaire (Sambrook et Russel, 2001). L'ADN polymérase, les rNTP, les enzymes de restriction, la T4 ADN ligase ont été achetés chez Stratagène, Invitrogen, NEBiolabs ou Promega. Les oligonucléotides, utilisés comme amorces pour les réactions de PCR, ont été obtenus chez Eurogentec.

1.1. AMPLIFICATION DE L'ADN PAR PCR

Nos mutants ont été obtenus par PCR (*polymerase chain reaction*). C'est une méthode qui permet d'amplifier des séquences d'ADN grâce à des amorces spécifiques (= brins d'ADN simple brin), de nucléotides et d'une ADN polymérase. Elle comporte toujours 3 étapes : dénaturation de l'ADN à 94°C, hybridation de l'amorce à une T° variable (de 45 à 60°C) et polymérisation à 72°C.

1.1.1. Construction p40 G37N

Ce mutant a été obtenu par 3 PCR successives avec recouvrement (*overlap extension*) (Sambrook et Russel, 2001). La première PCR a été réalisée avec le vecteur pCMV•SPORT6 contenant la séquence nucléotidique de p40 et les amorces sens G37N-2 (5'-GGCTGTAATGGAAGCCAGGAGCACAGCTTCAAGCA-3') et antisens G37N-1 (5'-GGGCTCAGCTGGCTCATTGATGGG-3') qui contient un site de restriction *Pvu* II. Elle a permis d'amplifier un fragment de 1023 paires de bases (pb). La 2^{ème} PCR a été réalisée avec le même vecteur mais avec des amorces différentes : l'amorce sens, G37N-4 (5'-GCCTATTTAGGTGACACTATAGAAC-3') qui s'apparie avec la séquence du promoteur SP6 et l'amorce antisens, G37N-3 (5'-GCTTCCATTACAGCCCTCAGCTAC-AAAGTTGTC-3'). Elle a conduit à l'obtention d'un fragment de 280 pb. Ces 2 fragments de PCR ont été purifiés sur des petites colonnes de chromatographie (Qiagen) et puis mélangés pour permettre l'amplification de la séquence complète de p40 avec les amorces G37N-4 et G37N-1. Le fragment de 1286 pb ainsi obtenu a été digéré avec les enzymes de restriction *Sal* I et *Pvu* II pour être sous-cloné dans le vecteur pCMV•SPORT6.

1.1.2. Construction p40 A77N

Dans un premier temps, nous avons essayé d'obtenir la construction A77N avec un kit de mutagenèse dirigée, commercialisé par la firme Stratagène (Amsterdam, NL). Pour cela, nous avons choisi des amorces où la mutation désirée se trouve au centre de la séquence nucléotidique : A77NS (5'-AGGCAGAAGACAGTCAA**A**CTCCAGTGTAGAGCCCC-3') et A77NAS (5'-GCTGGGGCTCTACACTGGAGTT**T**GACTGTCTTCTGCCTTGG-3'). Ces 2 amorces s'apparient au même endroit sur la séquence de p40 mais sur les brins opposés. A l'issue de la réaction de PCR, on est censé obtenir le plasmide muté perforé et le plasmide parental. Celui-ci étant méthylé, il est spécifiquement dégradé lors d'une incubation avec l'enzyme *Dpn* I. Le plasmide muté est ensuite introduit dans des bactéries XL-1 blue pour y être réparé et amplifié.

Dans un second temps, n'ayant obtenu aucun clone positif avec ce kit, nous avons décidé de suivre la stratégie d'extension par recouvrement en utilisant les amorces A77NS et A77NAS comme amorces internes. La première PCR a été réalisée avec le vecteur pCMV•SPORT6 contenant la séquence nucléotidique de p40 et les amorces sens A77NS et antisens G37N-1. Cette première PCR a permis d'amplifier un fragment de 913 pb. La deuxième PCR a été réalisée avec l'amorce sens, G37N-4 et l'amorce antisens, A77NAS. Elle a conduit à l'obtention d'un fragment de 413 pb. Ces 2 fragments ont été purifiés et ont servi de matrice pour la troisième PCR réalisée en présence des amorces G37N-4 et G37N-1. Le fragment de 1286 pb obtenu par cette 3^{ème} PCR est de 1286 pb. Il a été digéré par les enzymes de restriction *Sal* I et *Pvu* II pour être sous-cloné dans le vecteur pCMV•SPORT6.

1.1.3. Construction p40-GFP

La séquence de p40 a été amplifiée par PCR pour permettre son sous-clonage dans pEGFP-N1 (Clontech). La PCR a été réalisée en utilisant comme vecteur pCMV•SPORT6 contenant la séquence nucléotidique de p40 et les oligonucléotides 40NS et 40NAS. L'amorce sens 40NS (5'-GATATCGTCGACCCACGC-GTCCG-3') renferme un site de restriction *Sal* I et s'apparie avec une séquence en amont du codon ATG. L'amorce antisens 40NAS (5'-AACGGGATCCGCGCTGGCTTCATTGAT-GGGAGTCCG-3') renferme un site de restriction *Bam*H I. Le fragment amplifié (1271 pb) a été digéré par les enzymes de restriction *Sal* I et *Bam*H I et sous-cloné dans le vecteur pEGFP-N1. Ensuite, la séquence de p40, couplée à la séquence de la GFP, a été transférée du vecteur pEGFP-N1 vers le vecteur pCMV•SPORT6 après digestion avec les enzymes de restriction *Sal* I et *Not* I.

1.1.4. Construction GFP-p40

Dans un premier temps, la GFP a été amplifiée par PCR à partir du vecteur pEGFP-C1 (Clontech) avec les amorces sens CS2 (5'-AACGGAATTTCGCCACCATGGTGAGCAA GGG-C-3') et antisens CaS2 (5'-TTCCGCTCGAGATCTGAGTCCGGACTTGT-3'). Le fragment obtenu (759 pb) a été digéré avec les enzymes de restriction *Eco*R I et *Xho* I.

Ensuite, p40 a été amplifiée par PCR à partir du vecteur pCMV•SPORT6 contenant la séquence nucléotidique de p40 grâce aux amorces 40CS (5'-ACCGCTCGAGCTATGGCCT-GGACTAAGTACCAG-3') et G37N-1. Le fragment obtenu a été digéré par les enzymes *Xho* I et *Pvu* II.

Les 2 fragments de PCR ainsi digérés, ont été insérés dans le vecteur pCMV•SPORT6, préalablement digéré avec les enzymes *Eco*R I et *Pvu* II en incubant l'ADN avec la T4 ADN ligase.

1.2. LIGATION

Cette étape permet la ligation entre un (ou plusieurs) insert(s) et un vecteur plasmidique qui présentent des extrémités compatibles. La ligation a été effectuée par la T4 ADN ligase qui catalyse la formation de liens phosphodiester entre les extrémités 5'-P et 3'-OH de molécules d'ADN bicaténaire, en utilisant l'ATP comme cofacteur.

Pour chaque ligation, 1 µl de T4 ADN ligase, 1 µl de tampon et différents rapports de concentration insert/vecteur ont été utilisés dans un volume final de 10 µl. Les mixtures de ligation étaient incubées à température ambiante pendant 2 h pour la ligation de bouts francs et seulement 10 minutes pour la ligation d'extrémités cohésives. Ensuite, elles étaient transférées à 16°C pendant environ 3 h, avant de réaliser la transformation.

1.3. TRANSFORMATION BACTÉRIENNE

Les bactéries électrocompétentes ont été obtenues à partir d'une suspension bactérienne en phase de croissance exponentielle ($DO_{600} = 0,5-0,7$). Les bactéries étaient sédimentées par centrifugation (8000 rpm, 15 minutes, rotor Beckman JS 7.5), puis lavées 2 fois dans un grand volume d'eau glacée et une fois dans 40 ml de glycérol 10 % avant d'être resuspendues dans un petit volume de glycérol 10 %. Entre chaque lavage, les bactéries étaient centrifugées à 2800 rpm, 10 minutes (rotor Beckman Coulter SX 4250). Les bactéries ainsi obtenues étaient conservées à -70°C dans des tubes Eppendorf stériles.

Pour la transformation, 40 μl de bactéries électrocompétentes et 1 μl de mixture de ligation étaient mis en présence dans des cuvettes d'électroporation (Eurogentec) et un pulse électrique était appliqué. Les bactéries étaient transférées dans 900 μl de milieu LB puis incubées 1 h à 37°C dans des tubes de 15 ml. Ensuite, elles étaient étalées (250 μl) sur des boîtes de Pétris contenant du milieu LB et de l'ampicilline (100 $\mu\text{g/ml}$). Les boîtes étaient déposées (à l'envers) dans une étuve à 37°C .

1.4. MINIPRÉPARATION D'ADN ET DIGESTIONS CONTRÔLES

Le lendemain, des colonies isolées étaient prélevées sur les boîtes de Pétri et transférées dans des tubes de 15 ml contenant du milieu LB liquide et de l'ampicilline (100 $\mu\text{g/ml}$). Après une nuit d'incubation à 37°C sous agitation constante (250 rpm), 1 ml de ces suspensions bactériennes était centrifugé pendant 2 minutes à 13.000 rpm (centrifugeuse Eppendorf) afin de sédimenter les bactéries. Les culots bactériens étaient resuspendus dans 100 μl de solution contenant du Tris-HCl 25 mM pH 8, de l'EDTA 10 mM pH 8 et du glucose 50 mM. Les bactéries étaient lysées dans 200 μl de NaOH 0,2 N/SDS 1%. Après 5 minutes d'incubation sur la glace, la réaction était arrêtée par addition de 150 μl d'acétate de potassium (KAc 3 M / HCOOH 5M). Dans ces conditions, l'ADN génomique, les protéines et les débris cellulaires forment un précipité que l'on sédimente par centrifugation à 13.000 rpm pendant 10 minutes (4°C).

L'ADN plasmidique, contenu dans le surnageant de centrifugation, était ensuite extrait dans 400 μl de phénol/chloroforme/isoamylalcool (25:24:1) puis dans 400 μl de chloroforme/isoamylalcool (24:1). Ensuite, l'ADN était précipité avec 1 ml d'éthanol absolu conservé à -20°C . Après 5 minutes d'incubation à température ambiante et 10 minutes de centrifugation à 13.000 rpm (4°C), le culot était lavé avec 1 ml d'éthanol 70 %. Finalement, il était resuspendu dans 30 μl du TE (Tris-HCl 10 mM pH 7.4/ EDTA 1 mM pH 8) contenant de la ribonucléase A.

Les digestions contrôles étaient réalisées avec des enzymes de restriction dans un volume final de 15 μl . Après une heure d'incubation à 37°C , un échantillon était déposé sur gel d'agarose afin d'analyser la taille des fragments.

1.5. MAXIPRÉPARATION D'ADN

Pour réaliser des maxipréparations d'ADN, nous avons utilisé un kit de la firme Qiagen (QIAfilterTM Plasmid Maxi Kit).

Ici aussi les bactéries étaient lysées en milieu alcalin, mais le précipité formé par l'ADN génomique, les protéines et les débris cellulaires après l'ajout d'acétate d'ammonium était éliminé sur un filtre (tamis moléculaire). Ensuite, l'ADN plasmidique était purifié par chromatographie d'affinité sur colonne de silice. Cette méthode permet d'obtenir une grande

quantité d'ADN, directement utilisable pour le séquençage, la transcription *in vitro* ou les transfections de cellules eucaryotes. Pour ces maxipréparations, nous avons suivi le protocole fourni par la firme.

2. TRANSCRIPTION *IN VITRO*

Le plasmide (pCMV•SPORT6) contenant la protéine d'intérêt a été tout d'abord linéarisé avec l'enzyme de restriction *Xba* I pour p40-WT, p40-G37N, p40-A77N, GFP-p40 et avec l'enzyme *Xho* I pour p40-GFP. L'ARNm a été synthétisé (dans 70 µl) à partir de cet ADN linéarisé en utilisant la SP6 ARN polymérase (0,5 U/µl, Proméga), du tampon de transcription, des rNTP (0,5 mM chacun), de la RNAsine (1 U/µl, Proméga), du DTT (10 mM). Après 2 h d'incubation, l'ARNm a été extrait par un mélange de phénol/chloroforme à pH acide puis, précipité avec 1/10^{ème} de volume d'acétate d'ammonium et 2,5 volumes d'éthanol 95 %. L'ARNm, resuspendu dans de l'eau stérile, a été aliquoté et stocké à -70°C. Dans les 2^{ème} et 3^{ème} parties de notre travail, nous avons synthétisé l'ARNm en utilisant la SP6 ARN polymérase de chez Roche, en ajoutant la coiffe (m⁷G(5')ppp(5')G) dans le milieu de transcription.

3. TRADUCTION *IN VITRO*

3.1. SYSTÈME DE TRADUCTION *IN VITRO*

Nos protéines d'intérêt ont été synthétisées en présence d'un lysat de réticulocytes de lapin (Proméga), en présence ou en absence de microsomes. Les microsomes utilisés étaient des microsomes de pancréas de chien (Proméga) ou des microsomes provenant d'une fraction P de foie de rat (voir § 3.6). La détection des protéines a été rendue possible par l'incorporation de [³⁵S] méthionine dans la mixture de traduction. La composition exacte des 2 types de mixtures de traduction est reprise ci-dessous. Après la traduction, environ 1/5^o de la mixture était dilué dans l'eau et solubilisé dans du Tris-HCl 50 mM pH 6,8 contenant du SDS 2 %. Ensuite, dans certains cas, les échantillons étaient chauffés à 70 °C pendant 10 min et déposés sur gel d'acrylamide pour permettre la séparation des protéines par électrophorèse (voir § 6). Dans d'autre cas, les échantillons étaient soit immunoprécipités (voir § 5), soit précipités à l'acide trichloracétique 10 %.

Mixture de traduction sans microsomes
17,5 µl de lysat de réticulocytes
0,5 µl d'acides aminés
1,5 µl de ³⁵ S méthionine
1 µl d'ARNm préchauffé 3 min à 65°C
4,5 µl d'H ₂ O stérile

Mixture de traduction avec microsomes
17,5 µl de lysat de réticulocytes
0,5 µl d'acides aminés
1,5 µl de ³⁵ S méthionine
1 µl de microsomes
1 µl d'ARNm préchauffé 3 min à 65°C
3,5 µl d'H ₂ O stérile

3.2. PARTITION DANS LE TRITON X-114

10 µl de mixture de traduction ont été ajoutés à 200 µl d'une solution contenant du Tris-HCl 10 mM pH 7,4, du NaCl 150 mM et du Triton X114 1 % précondensé (Sigma-Aldrich). Après 5 minutes d'incubation sur la glace, cette mixture était déposée sur un coussin de saccharose 6

% (w/v), Tris-HCl 10 mM pH 7.4, NaCl 150 mM et Triton X114 0,06 % et transférée à 30°C pendant 3 minutes. Ensuite, les échantillons étaient centrifugés pendant 3 minutes à 3000 g (centrifugeuse TOMY) afin d'obtenir 2 phases. La phase supérieure était enlevée et traitée avec du Triton X-114 0,5 %. Après 5 minutes d'incubation, elle était redéposée sur le même coussin de saccharose, incubée 3 minutes à 30°C et recentrifugée. A l'issue de cette séparation de phase, 150 µl de phase aqueuse étaient prélevés et la phase détergente était ajustée à un volume de 150 µl avec du Tris-HCl 10 mM pH 7.4, NaCl 150 mM (TBS). Finalement, les protéines contenues dans les 2 phases étaient concentrées sur des petites colonnes Millipore (Biomax, 10 kDa) par centrifugation à 12000 rpm pendant 20 min (4°C), solubilisées et déposées sur gel d'acrylamide 12 %.

3.3. ASSOCIATION MEMBRANAIRE

3.3.1. Centrifugation sur coussin de saccharose

Après traduction *in vitro*, réalisée en présence de microsomes, 10 µl de mixture de traduction étaient dilués avec 15 µl de TBS et puis transférés dans un tube Eppendorf contenant 120 µl de saccharose 1 M (préparé dans du TBS). Après 30 minutes de centrifugation à 135.000 g dans un rotor Beckman TLA 100.3, les culots étaient directement solubilisés tandis que les protéines p40 contenues dans les surnageants étaient concentrées par immunoprécipitation (voir § 5).

3.3.2. Extraction au Carbonate

Dans certaines expériences, les culots résultant de la centrifugation sur coussin de saccharose, étaient resuspendus dans 700 µl de carbonate de sodium 0,1 M pH 11,5. Après 30 minutes d'incubation, les mélanges étaient déposés sur 100 µl de saccharose 0,3 M (préparé dans du Tris-HCl 10 mM pH 7,4) et centrifugés pendant 2 heures à 116.500 g (rotor Beckman TLA 100.3). Les culots étaient solubilisés et les protéines p40 contenues dans les surnageants étaient immunoprécipitées après ajustement du pH.

3.4. DIGESTION AVEC LA PROTÉINASE K

Après la traduction *in vitro*, réalisée en présence de microsomes, du CaCl₂ 10 mM était ajouté à la mixture de traduction (50 µl). Celle-ci était ensuite divisée en 3 parts égales. Le premier tiers était laissé sur la glace sans aucun traitement, le deuxième était incubé avec 100 µg/ml de protéinase K (Roche) préparée avec du tampon Tris-HCl 50 mM pH 7.4 et du CaCl₂ 10 mM. Le dernier tiers était mélangé avec du Triton X-100 (1 %) avant d'être digéré avec la protéinase K. Après 1 h d'incubation sur la glace, la digestion avec la protéinase K était arrêtée par ajout de PMSF 5 mM. 10 minutes plus tard, un échantillon de chaque mixture était solubilisé et déposé sur un gel d'acrylamide. Dans certaines expériences, les protéines contenant la GFP étaient immunoprécipitées avec l'anticorps anti-GFP après addition de tampon PBS/Triton 1 % dans le reste de la mixture de traduction.

3.5. DIGESTION AVEC LA TRYPSINE

La mixture de traduction a été divisée en 3 aliquotes de 9 µl. A ces 9 µl ont été ajoutés soit 1 µl d'eau, soit 1 µl de trypsine (1 mg/ml) (Promega), soit 1 µl de trypsine plus 1,2 µl de Triton

X-100 10 %. Les digestions ont été réalisées pendant 1 h sur la glace puis stoppées par addition de 1 µl d'inhibiteur de la trypsine provenant des graines de soja (*Soybean trypsin inhibitor*, 10 mg/ml). Une partie de ces mixtures a été directement solubilisée et déposée sur un gel d'acrylamide 12 %. Dans certaines expériences, les protéines p40-GFP et GFP-p40 ont été immunoprécipitées avec l'anticorps anti-GFP après l'addition de tampon PBS/Triton 1 % dans le reste de la mixture de traduction.

3.6. PRÉPARATION DE MICROSOMES DE FOIE DE RAT

Les microsomes de foie de rat ont été obtenus par centrifugation différentielle en suivant un protocole simplifié du schéma classique de de Duve (De Duve et al., 1955).

Le foie de rat a été homogénéisé dans du saccharose 0,25 M contenant du DTT (2 mM) à l'aide d'un homogénéisateur de type Potter-Elvehjem. Après sédimentation des noyaux (centrifugeuse Internationale : 1 x 10 minutes à 1.700 rpm et 1 x 10 minutes à 1.500 rpm), 10 ml de surnageant post-nucléaire ont été centrifugés à 25.000 rpm pendant 7 minutes (centrifugeuse Beckman L7.35, rotor 50 Ti) afin de sédimenter les mitochondries, les lysosomes et les peroxysomes. La fraction P a ensuite été séparée de la fraction non sédimentable (S) par centrifugation à haute vitesse (135.000 g, 10 minutes, dans l'ultracentrifugeuse Beckman Optima-TLX, rotor 100.3). Le culot ainsi obtenu a été resuspendu délicatement dans 200 µl de saccharose 0,25 M/ DTT 2mM contenant 1 U/µl d'inhibiteur de ribonucléases (RNAsine, Promega).

4. EXPRESSION DE P40 DANS LES CELLULES COS

Les cellules ont été cultivées à 37°C dans du milieu DMEM (Cambrex) contenant du sérum de veau fœtal (10 %) et des antibiotiques (streptomycine 0,1 mg/ml / pénicilline 100 U/ml). Les cellules (cultivées dans des boîtes de Pétris de 10 cm et confluentes à 30 %) ont été transfectées dans un volume de 10 ml avec 6,6 µg d'ADN plasmidique mélangés à 27 µl de FuGENE (Roche). 48 h après transfection, les cellules ont été privées de méthionine pendant 1 h puis marquées métaboliquement avec de la [³⁵S] méthionine (20 µCi/ml) pendant 4 h à 37°C. Ensuite les cellules ont été lavées avec du tampon salin (HBSS, Cambrex) avant d'être homogénéisées dans du saccharose 0,25 M glacé, à l'aide d'un homogénéisateur de type Dounce (Piston serré). Après sédimentation des noyaux, les compartiments subcellulaires (fraction MLP) ont été obtenues par centrifugation à haute vitesse (135.000 g, 15 minutes, rotor TLA 100.3). Cette fraction MLP a été lysée dans du tampon salin (PBS) contenant du Triton X-100 1 % et des inhibiteurs de protéases. Enfin, les protéines p40 ont été immunoprécipitées avec un anticorps de lapin préparé à Grenoble (Prof. J. Garin, CEA) en suivant le protocole décrit au point 5.

5. IMMUNOPRÉCIPITATION

Les échantillons ont été mélangés avec un tampon de lyse contenant du PBS/Triton 1 % et des inhibiteurs de protéases (voir ci-dessous). Les lysats ont été agités toute une nuit en présence de l'anticorps anti-p40 (30 µl) ou l'anticorps anti-GFP (10 µl, Santa Cruz, Sc 8334). Le lendemain, 50 µl de protéine A-sépharose ont été ajoutés aux lysats. La protéine A-sépharose se lie sur les extrémités Fc des anticorps tandis que les billes de sépharose entraînent les complexes anticorps-antigène dans le fond du tube. Après 2 h d'incubation, les complexes anticorps-antigène-protéine A-sépharose ont été sédimentés par centrifugation pendant 5 minutes à 3400 rpm. Les culots ont été lavés 4 fois avec du tampon RIPA et une fois avec du

tampon PBS (voir ci-dessous). Les culots ont ensuite été solubilisés et chauffés pendant 10 minutes à 70°C puis déposés sur gel d'acrylamide 10 ou 12 %.

Tampon de lyse	Tampon RIPA	PBS 10X concentré
PBS pH 7,4 Triton X-100 1% <u>Inhibiteurs de protéases:</u> Iodoacétamide (IAA) 5 mM PMSF 1 mM EDTA 1 mM Aprotinine 2,5 µg/ml Leupeptine 1 µg/ml Pepstatine 0,5 µg/ml	Tris-HCl 50 mM pH 7,4 NaCl 120 mM Triton X-100 1% SDS 0,1 % DOC 1%	NaCl 1,5 M Na ₂ HPO ₄ (2H ₂ O) 100 mM NaH ₂ PO ₄ (H ₂ O) 89 mM

6. ELECTROPHORÈSE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE-SDS

6.1. GELS D'ACRYLAMIDE EN PRÉSENCE DE TRIS-GLYCINE

Les gels d'acrylamide discontinus comprennent 2 parties : le gel d'empilement (ou stacking gel) assez lâche et le gel de séparation (ou resolving gel) dont le pourcentage d'acrylamide varie en fonction du poids moléculaire (PM) des protéines à analyser. Plus celui-ci est élevé, plus le pourcentage d'acrylamide doit être faible.

Les gels de polyacrylamide sont composés de chaînes d'acrylamide polymérisé qui forment un réseau avec un agent bifonctionnel, le N, N', méthylène bisacrylamide. La polymérisation de l'acrylamide est initialisée par le persulfate d'ammonium (APS) et catalysée par le TEMED (N,N,N',N'-tétraméthylethylène diamine).

Les échantillons migrent verticalement dans les 2 gels, entraînés par un courant électrique qui passent entre 2 électrodes. Dans ce système discontinu, le tampon des réservoirs du haut et du bas a un pH et une force ionique différents des tampons utilisés pour couler les gels. Cela permet une bonne séparation des protéines de 20 à 150 kDa. Dans nos expériences, des étalons de PM connu, marqués au ¹⁴C (Amersham-Biosciences), ont été déposés en même temps que nos échantillons pour estimer le PM des chaînes peptidiques intéressantes.

Après électrophorèse, les gels ont été fixés dans un mélange d'acide acétique (10 %) et de méthanol (45 %), séchés pendant 1 h à 80°C et exposés sur un écran de PhosphorImager pendant 24 heures. Les écrans ont été analysés avec le logiciel Optiquant connecté à un appareil de balayage (Cyclone, Canberra Packard).

Tampon de solubilisation 2X	Étalons de PM
Tris-HCl 0,1 M pH 6,8 Glycérol 10 % Bleu de Bromophénol 0,2 % (w/v) SDS 4 % DTT 200 mM	200 kDa myosine 97,4 kDa phosphorylase B 66 kDa sérum albumine bovine 46 kDa ovalbumine 30 kDa anhydrase carbonique 14,3 kDa lysozyme

Gel de Séparation 12 %	Gel d'empilement 5 %
11,8 ml H ₂ O 12 ml Acrylamide/Bisacrylamide 30 % (37,5:1) 5,6 ml Tris-HCl 2 M pH 8,8 300 µl SDS 10 % 300 µl APS 10 % 24 µl TEMED	8,4 ml H ₂ O 2,5 ml Acrylamide/Bisacrylamide 30 % (37,5:1) 3,75 ml Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 150 µl SDS 10 % 150 µl APS 10 % 15 µl TEMED

6.2. GELS D'ACRYLAMIDE EN PRÉSENCE DE TRIS-TRICINE

Dans les gels Tris-glycine, les protéines sont concentrées dans le gel d'empilement grâce à la glycine (pKa = 9,6) qui migre très lentement à pH acide. Cela permet une bonne résolution des protéines de grande taille mais pas des protéines de PM inférieur à 20 kDa qui forment avec le SDS des agrégats de la même taille que les micelles de SDS. Dans ce cas, il vaut mieux utiliser des gels Tris-Tricine, dans lesquels c'est la tricine qui entraîne les protéines à travers les gels d'acrylamide, préparés dans du tampon Tris-HCl 1 M pH 8,45. Ce système permet une résolution de protéines de PM inférieur à 20 kDa sur des gels d'acrylamide de pourcentage plus faible que dans le système Tris-Glycine (Schägger et von Jagow, 1987)

Tampon de solubilisation 2X
4 mg de Serva Blue Coomassie G250 2,4 g de glycérol 2 ml de Tris-HCl 0,5 M pH 6.8 0,8 g SDS 0,4 ml de β-mercaptoéthanol Ajuster à 10 ml avec de l'eau

Tris-HCl 3M pH 8,45 / SDS 0,3 %
90,75 g de Tris 150 ml d'eau Ajuster le pH à 8.45 avec de l'HCl 1 N Ajouter de l'eau jusqu'à 250 ml Filtrer sur filtre de 0,45 µm Ajouter 0,75 g de SDS

Gel de séparation 15 %
4 g de glycérol 9,8 ml d'Acrylamide/Bisacrylamide 30 % (37,5 :1) 10 ml de Tris-HCl 3M pH 8,45/ SDS 0,3 % 7,03 ml d'eau Dégazer 15 min 150 µl d'APS 10 % frais 15 µl de TEMED

Gel d'empilement 4 %
1,62 ml d'Acrylamide/Bisacrylamide 30 % (37,5 :1) 3,1 ml de Tris-HCl 3M pH 8,45/ SDS 0,3 % 7,78 ml d'eau Dégazer 15 min 100 µl d'APS 10 % frais 20 µl de TEMED

RESULTATS ET DISCUSSION

Depuis plusieurs années, notre laboratoire contribue à l'étude protéomique des lysosomes en collaboration avec deux laboratoires étrangers. Notre laboratoire participe à cette étude de deux façons. D'une part, en fournissant des échantillons hautement purifiés en lysosomes. D'autre part, en validant la localisation des protéines nouvellement identifiées, et enfin, en prenant en charge certains travaux de biologie cellulaire concernant ces protéines lysosomales nouvelles. Au cours d'une étude, réalisée au sein du laboratoire du Professeur J. Garin (CEA, Grenoble), visant la découverte de nouvelles protéines membranaires lysosomales, un peptide de 15 acides aminés a été séquencé par spectrométrie de masse. Une recherche d'homologie de séquence avec le programme BLASTp a montré que ce peptide correspondait parfaitement (100 % d'identité) avec un peptide présent dans une protéine hypothétique de souris de 41 kDa. Cette protéine, appelée p40, est très hydrophobe et, selon plusieurs modèles de prédiction (TMPred, PSORTII, TopPred et TMHMM2), elle contiendrait 9 segments transmembranaires (figure 7) mais rien ne permet de dire si les extrémités N-et C-terminales sont luminales ou cytosoliques (<http://www.expasy.ch>). Cependant, comme l'extrémité C-terminale renferme des signaux d'adressage aux lysosomes (Y³³³NGL et EQERLL³⁶⁰), il est tentant de proposer qu'elle se trouve du côté cytosolique. C'est pour cette raison que nous privilégions le modèle N-interne/C-externe, représenté à la figure 7. A remarquer également sur ce schéma que la distance entre deux segments hydrophobes successifs est parfois très réduite (seulement 8 acides aminés). L'examen *in silico* de la séquence primaire de p40 nous révèle en outre que p40 renferme 3 sites consensus de N-glycosylation : ¹¹⁰NMT, ²⁶⁹NIS et ²⁷⁷NFS. Cependant, si p40 possède effectivement 9 segments transmembranaires, il est peu probable que ces 3 sites soient glycosylés puisque, dans le modèle choisi, ils se trouvent soit dans la deuxième boucle cytosolique soit dans le huitième segment transmembranaire. Précisons que dans le modèle N-externe/C-interne, les 3 sites consensus de N-glycosylation se trouveraient dans des segments hydrophobes. Autrement dit, selon les modèles de prédiction, la protéine p40 ne devrait pas être glycosylée quelle que soit l'orientation des extrémités N- et C-terminales.

Au cours de ce travail, nous avons étudié la topologie membranaire de p40 dans un système de traduction *in vitro* en présence de microsomes. Pour cela, nous avons d'abord analysé certaines propriétés intrinsèques de p40-WT: hydrophobicité, glycosylation et association membranaire. Ensuite, nous avons essayé de déterminer, du moins partiellement, la topologie membranaire de p40 en construisant deux mutants de glycosylation (p40-G37N et p40-A77N) et deux protéines chimériques (p40-GFP et GFP-p40).

1. PROPRIETES INTRINSEQUES DE P40

Pour exprimer une protéine donnée à partir de l'ADNc, il faut d'abord transformer l'ADN complémentaire (ADNc) en ARN messager (ARNm). Cette étape, appelée transcription, est catalysée par une ARN polymérase. Ensuite, le message contenu dans l'ARNm (ou transcrit primaire) est décodé par la machinerie de traduction pour donner naissance à une protéine. Ces deux réactions (transcription et traduction) peuvent se faire *in vitro* dans le même tube à essai. Dans nos expériences, nous avons choisi de préparer un stock d'ARNm avant de réaliser les traductions *in vitro* dans un lysat de réticulocytes.

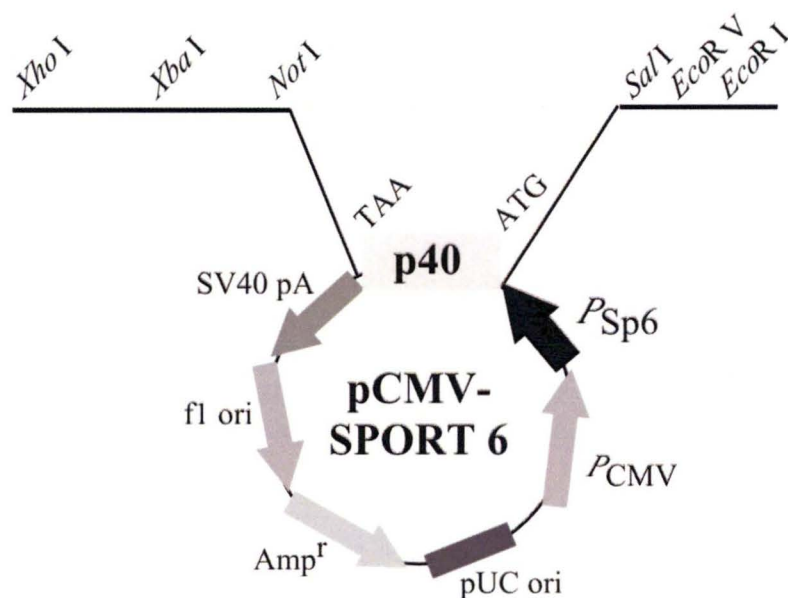


Figure 8 : Insertion de la séquence de l'ADNc de p40 dans le vecteur pCMV•SPORT6

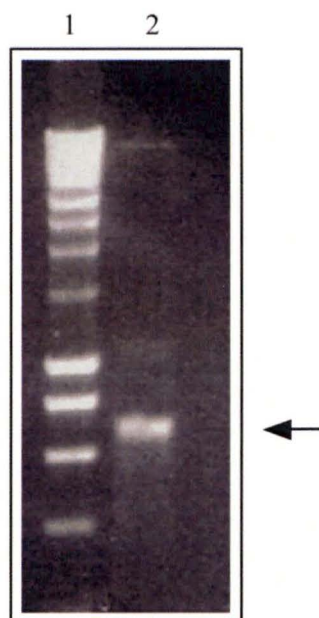


Figure 9 : Transcription *in vitro* de l'ADNc de p40 inséré dans le vecteur pCMV•SPORT6

Après linéarisation du vecteur pCMV•SPORT6, l'ADNc de p40, a été transcrit en ARNm par la SP6 ARN polymérase. Un échantillon a ensuite été soumis à une électrophorèse horizontale sur un gel d'agarose 1,2 %.

1.1. TRANSCRIPTION IN VITRO

La transcription commence par la reconnaissance et la fixation de l'ARN polymérase sur une séquence spécifique de l'ADN, située en amont du site d'initiation de la transcription: le promoteur. Ensuite, l'ARN polymérase sépare partiellement les deux brins de l'ADN pour permettre l'appariement des ribonucléosides triphosphate (rNTP) avec les bases complémentaires situées sur le brin anticodant (3' → 5') qui sert de modèle. Pendant l'étape d'élongation, l'ARN polymérase ajoute un à un les rNMP (ribonucléosides monophosphate) sur la chaîne d'ARN naissante, à partir des ribonucléosides triphosphate correspondants, en formant des liaisons phosphodiester et en libérant du pyrophosphate. Au fur et à mesure de son avancement sur le brin d'ADN, l'ARN polymérase déplie la double hélice devant elle et la replie derrière elle.

L'ADNc de p40 est inséré dans un vecteur d'expression eucaryote (pCMV•SPORT6) sous le contrôle du promoteur du phage SP6 (figure 8) Donc, pour obtenir les transcrits primaires, nous avons incubé le vecteur linéarisé (avec l'endonucléase *Xba* I) dans une mixture de transcription contenant de la SP6 ARN polymérase, des rNTP et un inhibiteur de RNase. Après 2h d'incubation à 37°C, nous avons extrait l'ARN dans du phénol acide et nous l'avons précipité avec de l'éthanol et de l'acétate de sodium (voir Matériel et Méthodes) pour le concentrer. Ensuite, nous avons fait migrer un échantillon d'ARN ainsi obtenu sur un gel d'agarose 1.2%. Dans l'expérience présentée à la figure 9, nous constatons que l'ARN forme une bande bien nette et bien visible, sans signe évident de dégradation. C'est un contrôle de qualité que nous avons effectué pour chaque préparation d'ARNm. Les standards utilisés ici sont des standards d'ADN, ils ne nous permettent donc pas de déterminer la taille du transcrit correspondant à p40.

1.2. TRADUCTION IN VITRO

Au cours de la traduction, les ribosomes viennent se fixer sur l'extrémité 5' de l'ARNm et se déplacent ensuite vers l'extrémité 3' en synthétisant la chaîne polypeptidique. La synthèse protéique commence presque toujours au niveau du premier codon AUG rencontré par les ribosomes sur la séquence de l'ARNm. Les codons situés sur l'ARNm s'apparient aux anticodons situés sur les ARN de transfert (ARNt) qui ont été préalablement aminoacylés à leur extrémité 3'. Quand l'appariement est correct, l'acide aminé est transféré sur la partie C-terminale de la chaîne polypeptidique naissante suite à la formation d'une liaison peptidique.

Pour obtenir *in vitro* une protéine à partir d'ARNm, il faut donc des acides aminés, des ribosomes, des ARNt, des facteurs d'initiation, d'élongation et de terminaison de la traduction et une source énergétique. Tous ces éléments sont présents dans les lysats de réticulocytes de lapin (RRL). Pour synthétiser p40, nous avons donc ajouté de l'ARNm codant pour p40 dans une mixture de traduction *in vitro* contenant des réticulocytes de lapin et de la méthionine radioactive pour visualiser la protéine par autoradiographie. Dans certains cas, nous avons également ajouté des microsomes. Ce sont des vésicules closes formées à partir du réticulum endoplasmique lors de l'homogénéisation du tissu et obtenue par fractionnement cellulaire. Elles permettent d'étudier certaines modifications co- et post-traductionnelles comme le clivage du peptide signal, la N-glycosylation ou la formation de ponts disulfure.

La figure 10 illustre une expérience de traduction *in vitro* de la protéine p40. Nous avons soumis un échantillon de mixture de traduction à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide 12% contenant du SDS. Dans ces conditions, des charges négatives du SDS

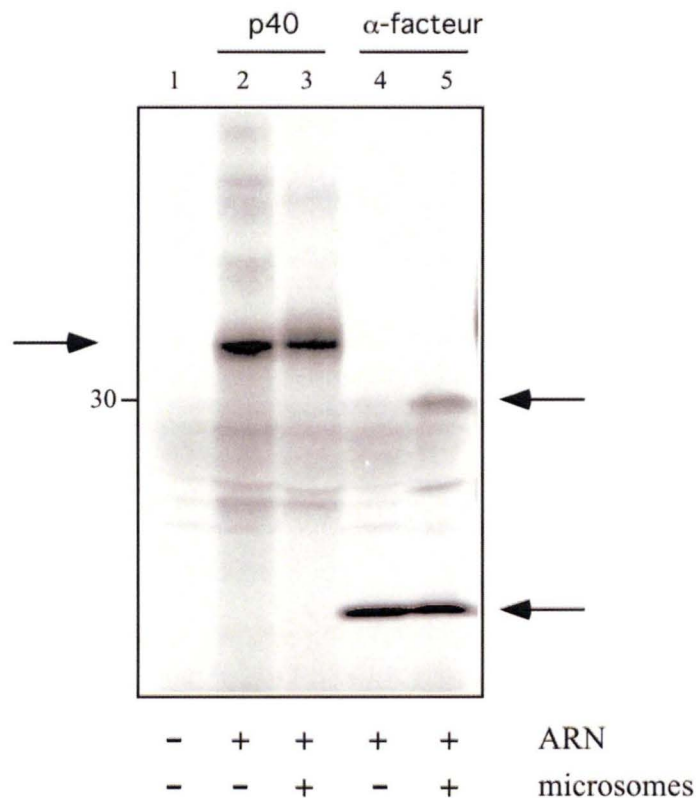


Figure 10: Traduction *in vitro* en absence ou en présence de microsomes

Après transcription *in vitro*, l'ARNm codant pour p40 a été ajouté à une mixture de traduction contenant un lysat de réticulocytes, des acides aminés, de la [35 S] méthionine et éventuellement des microsomes. Après 1 h d'incubation à 30°C, un échantillon a été soumis à une électrophorèse sur gel d'acrylamide 12 % en présence de SDS. Après fixation et séchage, les protéines radioactives ont été visualisées par autoradiographie.

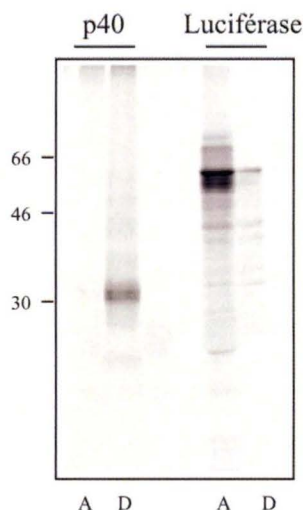


Figure 11: Partition dans le Triton X-114

Les mixtures de traduction ont été incubées avec du Triton X-114 pendant 5 minutes sur la glace et puis pendant 3 minutes à 30°C afin d'obtenir 2 phases distinctes : la phase aqueuse, supérieure (pistes A) et la phase détergente, inférieure (pistes D). La répartition des protéines entre les 2 phases dépend de leur hydrophobicité. Les protéines de chaque phase ont été concentrées, solubilisées et déposées sur un gel d'acrylamide 12 %.

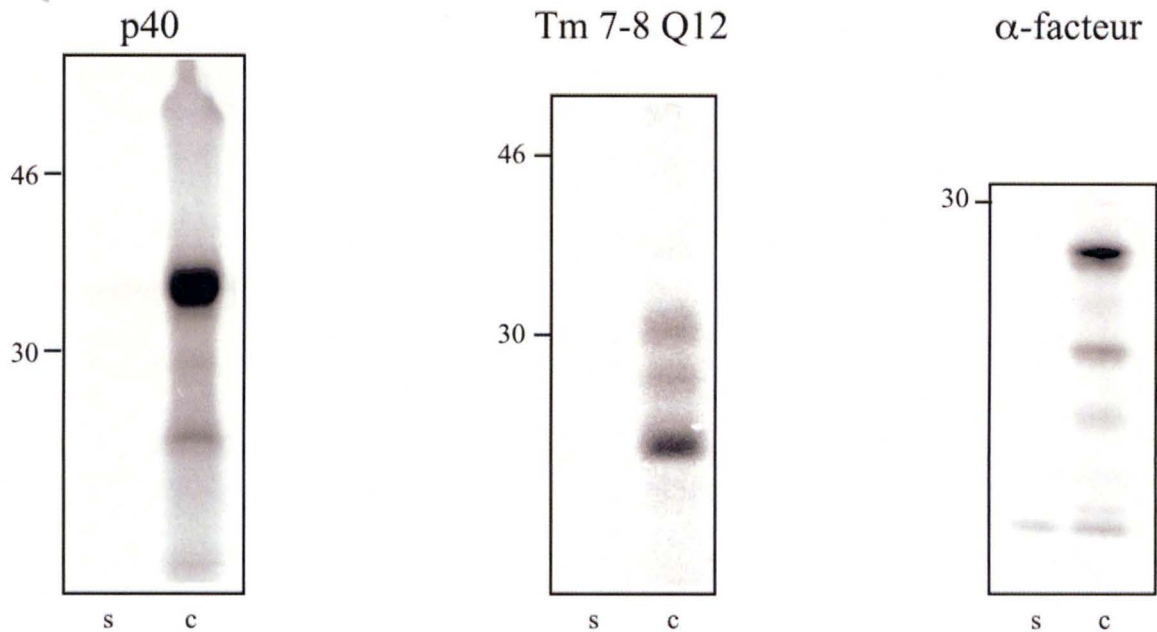
sont réparties sur toute la longueur des protéines dénaturées et la migration ne dépend donc plus que de la taille de la chaîne polypeptidique. Nous constatons que si nous omettons d'ajouter le transcrit, aucune protéine n'est synthétisée (piste 1). Par contre, en présence d'ARN codant pour p40, nous observons une protéine qui migre avec un poids moléculaire apparent (PM) de 33 kDa (piste 2). Sur base de la séquence primaire de p40, nous nous attendions à une protéine de taille supérieure. Cependant, plusieurs arguments nous permettent de dire que la bande de 33 kDa est bien p40. Premièrement, cette bande de 33 kDa n'apparaît pas en absence de transcrit codant pour p40. Deuxièmement, cette protéine est immunoprécipitée avec un anticorps spécifique de p40 (voir figures 19-23). Il se pourrait toutefois que la traduction de l'ARNm ait commencé non pas au premier codon AUG comme prévu mais au deuxième. Dans ce cas, la synthèse protéique resterait dans le même cadre de lecture mais la protéine serait raccourcie de 13 acides aminés. Nous ne pouvons pas exclure cette possibilité même si les nucléotides présents autour du premier codon (séquence Kozak) (Kozak, 1991) devraient favoriser l'initiation de la traduction à ce niveau.

La présence de microsomes dans la mixture de traduction ne modifie pas le PM apparent de la protéine p40. Il semble donc que p40 n'est pas glycosylée (piste 3). Ce n'est pas vraiment étonnant puisque selon les modèles de prédiction, les 3 sites consensus de N-glycosylation se trouvent dans une boucle cytosolique ou dans des segments transmembranaires. Cependant, nous avons vérifié que nos conditions de traduction *in vitro* permettaient la translocation et la glycosylation d'une protéine contrôle : l' α -facteur. L' α -facteur est une protéine de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Elle est synthétisée sous une forme précurseur de 18,6 kDa qui est glycosylée lors de son passage dans le réticulum endoplasmique pour donner une protéine mature de 32 kDa. Dans notre expérience, nous constatons en effet qu'en absence de microsomes, nous obtenons une bande de PM apparent proche de 18 kDa (piste 4). La présence de microsomes dans la mixture de traduction permet l'apparition de chaînes polypeptidiques supplémentaires, correspondant à des formes glycosylées de l' α -facteur (piste 5). En accord avec les renseignements obtenus par le fournisseur (Promega), la glycosylation n'est pas totale et la protéine mature de 32 kDa migre avec un poids moléculaire apparent plus faible que celui calculé sur base de sa séquence primaire. Quoique imparfait, ce résultat montre que la translocation et la glycosylation des protéines se produisent effectivement dans nos conditions expérimentales. Autrement dit, l'absence de glycosylation de p40 ne serait pas imputable à un dysfonctionnement de notre système de traduction *in vitro* mais plutôt à un problème d'accès de l'oligosaccharyl transférase aux sites potentiels de N-glycosylation. Il peut y avoir deux raisons à cela : soit les sites consensus de N-glycosylation se trouvent dans un segment transmembranaire ou dans une boucle cytosolique, soit p40 n'est pas correctement ancrée dans la membrane. Nous reviendrons sur cette question au point 1.2.2.

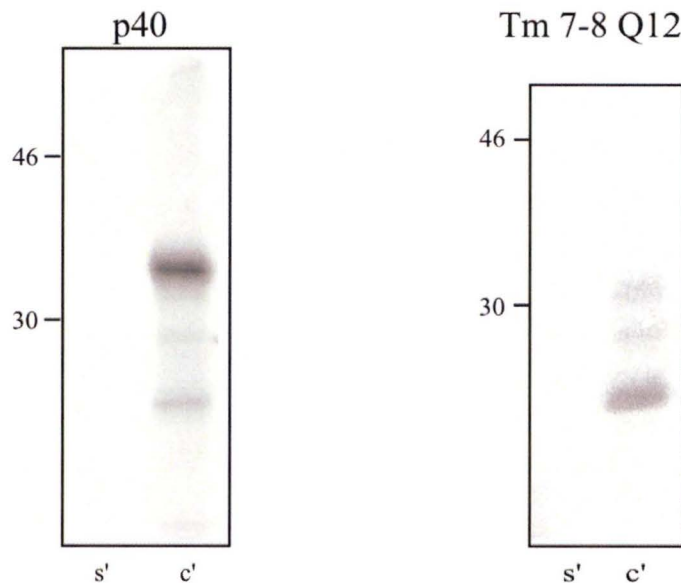
1.2.1. Partition dans le Triton X-114

La séquence primaire de p40 renferme de nombreux acides aminés hydrophobes. Nous avons étudié la partition de p40 pendant une séparation de phase dans une solution de Triton X-114 (Bordier, 1981). Le Triton X-114 est un détergent non ionique. En solution aqueuse, il va donc interagir avec les protéines hydrophobes pour former des micelles protéine-détergent. Lorsqu'on chauffe les échantillons, le poids moléculaire des micelles augmente et subitement, à une température donnée (différente selon le détergent), la solution devient trouble. A cette température, appelée point de fusion, une séparation de phase se produit : la phase détergente se retrouve progressivement en dessous de la phase aqueuse. Cette séparation de phase pourrait être due à l'association secondaire de petites micelles en micelles plus grandes qui s'agrègent. Par rapport au traditionnel détergent Triton X-100, le Triton X-114 présente un

A : Centrifugation sur coussin de saccharose



B : Extraction au carbonate après centrifugation sur coussin de saccharose



Figures 12 : Association membranaire

A. Les microsomes ont été sédimentés par centrifugation sur coussin de saccharose 1M (à 135.000 g, 30 minutes). **B.** Après centrifugation sur coussin de saccharose, les culots ont été soumis à une extraction avec du Na_2CO_3 0,1 M pH 11,5. Après 30 minutes d'incubation sur la glace, les membranes ont été sédimentées par centrifugation à haute vitesse (116.500 g, 2 h). Dans les deux cas, les protéines p40 contenues dans les surnageants (s et s') et les culots (c et c') ont été immunoprécipitées avec un anticorps anti-p40. Les protéines Tm 7-8 Q12 et l' α -facteur ont été précipités avec du TCA 10 %.

point de fusion à une température plus basse. Autrement dit, à 0°C, les deux détergents forment avec les protéines amphotères une solution micellaire claire. Lorsqu'on augmente la température, une séparation de phase se produit à 30°C pour le Triton X-114 et seulement à 64°C pour le Triton X-100. On peut donc plus facilement séparer les protéines hydrophobes (notamment les protéines membranaires) des protéines hydrophiles, en tirant parti de cette séparation de phase à 30°C dans le Triton X-114 (Lin et al., 2001).

Dans l'expérience présentée à la figure 11, nous constatons que p40 produite par traduction *in vitro* en absence de microsomes se retrouve entièrement dans la phase détergente (D). Par contre, la luciférase, une protéine hydrophile de 61 kDa utilisée comme contrôle, se trouve exclusivement dans la phase aqueuse (A). Ces résultats montrent que la protéine p40 se comporte comme une protéine hydrophobe après séparation de phase dans le Triton X114. Comme nous l'avons dit, ce résultat n'est pas surprenant compte tenu des 50 % de résidus hydrophobes présents dans la séquence de p40. Cela ne veut pas dire pour autant, qu'en présence de microsomes, elle va s'insérer dans la membrane.

1.2.2. Association membranaire

Avant d'analyser l'insertion membranaire de p40 dans la membrane des microsomes, nous avons essayé de tester l'ancrage membranaire de p40, traduite *in vitro* en présence de microsomes.

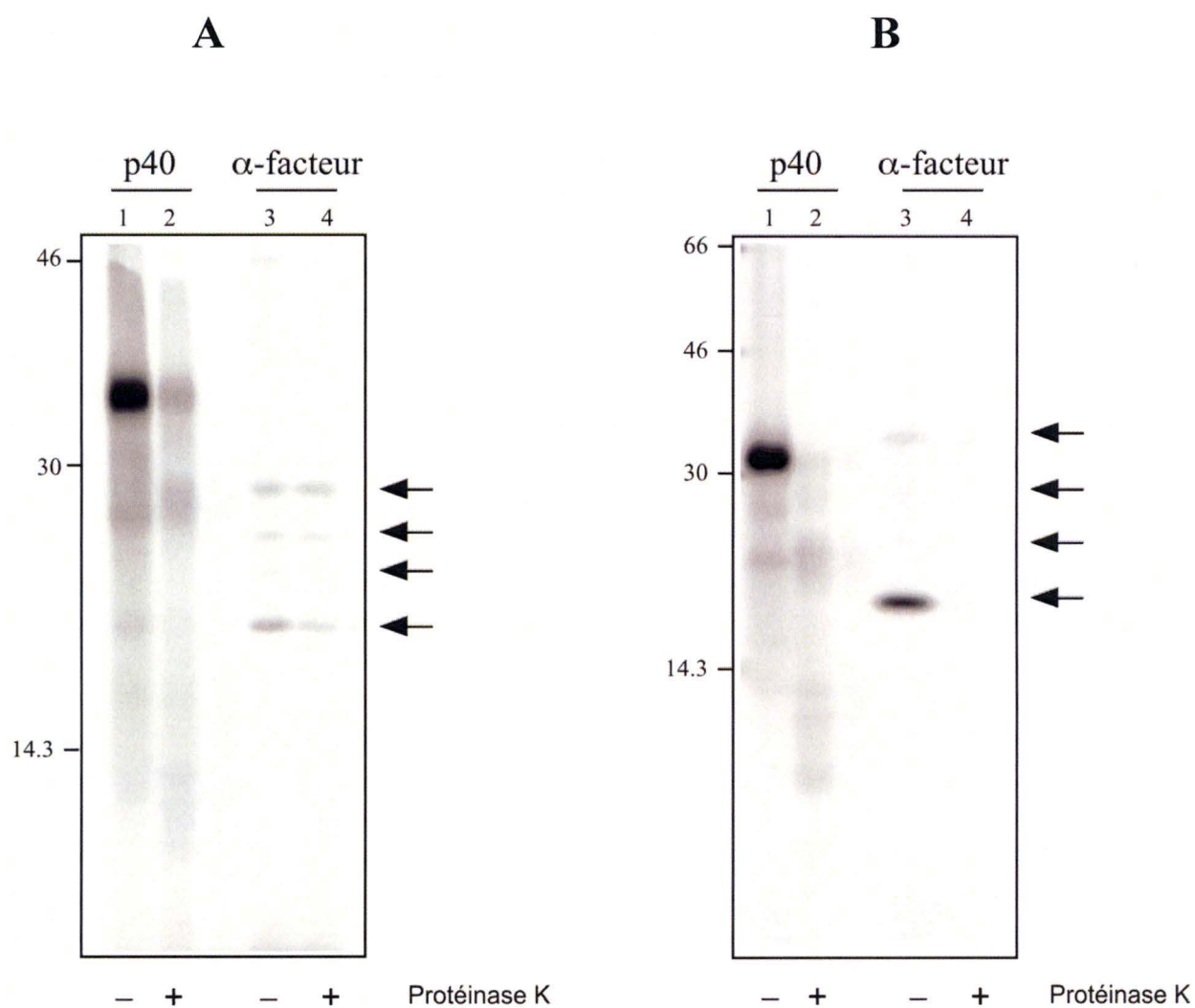
➤ Sédimentation sur coussin de saccharose

Cette technique consiste à sédimenter les membranes par centrifugation sur coussin de saccharose 1 M et à solubiliser ensuite les protéines associées au culot avec un détergent. Si la protéine est dans la lumière dans les microsomes ou si elle est associée aux membranes des microsomes, elle doit se retrouver dans le culot (c) de centrifugation (figure 12-A). C'est ce que nous observons avec p40 et avec Tm7-8 Q12, une protéine recombinante obtenue dans notre laboratoire et qui comporte 2 segments transmembranaires. Dans les mêmes conditions, les formes glycosylées de l' α -facteur se retrouvent également dans le culot membranaire (c) probablement parce qu'elles sont enfermées à l'intérieur des microsomes. Attention, cette expérience suggère que p40 est associée aux microsomes mais ne permet pas de dire s'il s'agit réellement d'une protéine membranaire intégrale. Elle pourrait être présente dans la lumière des vésicules ou s'adsorber sur les membranes, en interagissant avec des protéines ou des lipides membranaires. Dans ces deux cas, elle se retrouverait aussi dans le culot après sédimentation des membranes.

➤ Extraction au carbonate

L'extraction au carbonate 0.1 M à pH 11.5 est une technique fréquemment utilisée pour extraire des membranes, les protéines extrinsèques sans affecter la disposition des protéines transmembranaires ou fixées à la membrane par des ancrs lipidiques (Bascom et al., 1999; Schlegel et al., 2001; Skach et al., 1994). En microscopie électronique, on constate que le traitement carbonate provoque l'éclatement des vésicules en petits feuilletts membranaires (Fujiki et al., 1982).

Dans nos expériences, après traduction *in vitro*, nous avons d'abord sédimenté les microsomes par centrifugation sur coussin de saccharose (135.000 g, 30 min) avant de resuspendre le culot dans du Na₂CO₃ 0.1M pH 11.5 (figure 12-B). Après 30 min d'incubation sur la glace, nous avons sédimenté les membranes par centrifugation à haute vitesse (116.500 g, 2 h) sur un autre coussin de saccharose. Les protéines présentes dans le surnageant ont été



Figures 13: Digestion avec la Protéinase K

Les mixtures de traduction *in vitro*, contenant des microsomes, ont été incubées pendant 1 h sur la glace en présence (pistes 2 et 4) ou en absence (pistes 1 et 3) de protéinase K (100 µg/ml). La réaction a été arrêtée par addition de PMSF (5 mM). Après 10 minutes d'incubation, les mixtures ont été centrifugées 30 minutes à haute vitesse (135.000 g) sur un coussin de saccharose 1M. Les culots ont été solubilisés et déposés soit sur un gel d'acrylamide 17,5 % (**A**) soit sur un gel Tris-Tricine 16 % (**B**).

précipitées avec de l'acide trichloracétique 10 % (Tm 7-8 Q12) ou immunoprécipitées avec un anticorps après ajustement du pH (p40). Les protéines contenues dans le culot membranaire ont été solubilisées directement dans du SDS 2 %. Dans ces conditions, nous constatons que p40 et Tm 7-8 Q12 se retrouvent exclusivement dans le culot. Il n'y a rien dans le surnageant. A noter toutefois que l'intensité de la bande, correspondant à p40 ou à Tm 7-8 Q12, est beaucoup plus faible après cette deuxième étape. Nous avons recommencé plusieurs fois l'expérience en modifiant le protocole. Chaque fois, p40 se retrouve exclusivement dans le culot membranaire après extraction carbonate mais en faible quantité par rapport à la quantité de départ. Nous ne connaissons pas la cause de cette mauvaise récupération. Peut-être est-elle liée à la difficulté de resuspendre le culot après le traitement au carbonate. Quoiqu'il en soit, il semble qu'une quantité non négligeable de p40 soit fortement associée aux membranes des microsomes.

1.2.3. Digestion avec la protéinase K

Nous avons testé, d'une autre façon, la possibilité d'une association intrinsèque de p40 aux membranes, en réalisant une digestion avec la protéinase K (PK). Cette technique est souvent utilisée pour étudier la topologie membranaire d'une protéine (Perara et Lingappa, 1985 ; Raab-Graham et al., 1999; Wo et Oswald, 1995). La protéinase K est une endopeptidase très active. Elle est capable de cliver complètement une protéine puisqu'elle catalyse l'hydrolyse des liens peptidiques avec des acides aminés aliphatiques, aromatiques et hydrophobes. Lorsqu'elle est ajoutée dans un milieu d'incubation contenant des vésicules, elle dégrade les portions de protéines exposées à l'extérieur de ces vésicules mais pas les portions qui se trouvent du côté luminal ou dans les membranes.

Pour réaliser cette expérience, nous avons suivi un protocole décrit dans la littérature (Perara et Lingappa, 1985; Wo et Oswald, 1995). Il consiste à incubier un échantillon de mixture de traduction contenant des microsomes avec de la protéinase K (100 µg/ml), préparée dans un tampon Tris-HCl 50 mM/CaCl₂ 10 mM pH 7.4. Après 1 h d'incubation sur la glace, la réaction protéolytique est arrêtée par ajout de PMSF 5 mM, un inhibiteur de sérine protéases. Pour nous débarrasser des protéines provenant des lysats de réticulocytes et ainsi éviter d'avoir un bruit de fond trop important sur le gel d'acrylamide, nous avons sédimenté les membranes par centrifugation sur un coussin de saccharose avant de réaliser l'électrophorèse.

Les résultats présentés à la figure 13-A (pistes 1 et 2) montrent que la digestion à la protéinase K conduit à la disparition presque totale de p40 sur un gel Tris-Glycine de 17.5 %. Une possibilité d'interprétation de ce résultat serait que les membranes des microsomes ne soient pas intactes, permettant à la protéinase K d'atteindre la lumière des microsomes et d'exercer une digestion totale de la protéine. Pour s'assurer que la dégradation complète de p40 n'est pas due à la perte de l'intégrité de la membrane des microsomes, nous avons effectué en parallèle la même expérience en analysant le sort de l' α -facteur. Comme l' α -facteur mature est une protéine luminale, elle ne devrait pas être digérée par la PK. C'est ce que nous constatons : l'intensité de la bande de 28 kDa, correspondant à la forme complètement glycosylée de l' α -facteur est la même en présence ou en absence de traitement avec la PK (figure 13-A, pistes 3 et 4). Ce contrôle semble donc indiquer que la digestion totale avec la protéinase K résulte de l'exposition de la protéine p40 à la surface externe des microsomes.

Deux hypothèses pourraient expliquer la dégradation de p40 après addition de PK dans la mixture de traduction. Premièrement, p40 pourrait ne pas être intégrée dans la membrane des microsomes mais simplement adsorbée sur les membranes. Deuxièmement, p40 pourrait bien

être insérée dans la membrane mais les fragments générés par l'action de la protéinase K seraient trop petits ou ne contiendraient pas suffisamment de méthionines pour être visualisés par autoradiographie. Si on tient compte du modèle présenté à la figure 7, la digestion avec la protéinase K devrait aboutir à l'obtention de 5 fragments de 3.3 à 7.3 kDa, contenant maximum 3 méthionines (Tableau II)

Tableau II : Fragments générés par la digestion de p40 avec la protéinase K, selon le modèle de prédiction présenté à la figure 7

Fragment	Nombre d'AAs	Nombre de Met	PM estimé
1	30	2	3,3 kDa
2	64	3	7,1 kDa
3	46	1	5,1 kDa
4	66	3	7,3 kDa
5	65	1	7,2 kDa

Des fragments aussi petits sont difficilement visibles sur des gels Tris-Glycine. En effet, les électrophorèses sur des gels de polyacrylamide en présence de Tris-glycine ne permettent pas de visualiser clairement les protéines de poids moléculaire inférieur à 20 kDa. De plus, comme nous ne possédons pas de standards de PM inférieur à 14,3 kDa, il nous est difficile d'imaginer l'endroit où les fragments devraient se trouver. Pour séparer les protéines de petite taille, il est préférable d'utiliser les gels Tris-Tricine (Schagger et von Jagow, 1987). C'est pourquoi, nous avons répété la même expérience mais cette fois en déposant les échantillons sur un gel Tris-Tricine (figure 13-B). Là aussi, p40 semble complètement dégradée puisque nous ne parvenons pas à visualiser des peptides de l'ordre de 5-7 kDa. Cependant, nous devons rester prudents parce que, dans cette expérience, l' α -facteur n'est que faiblement glycosylé. Il est donc possible que la dégradation de p40 soit due au mauvais état de conservation des microsomes.

Nous nous sommes aussi demandés si les fragments ne pouvaient pas diffuser hors du gel pendant la migration, ou plus vraisemblablement pendant la fixation dans le méthanol et l'acide acétique. Pour le savoir, nous aurions pu découper le gel en petits morceaux, juste après la migration et mesurer la radioactivité dans chacun d'entre eux. De cette façon, nous aurions eu une idée de la présence ou non de fragments de petite taille dans le bas du gel.

En conclusion, cette expérience avec la protéinase K ne permet pas d'affirmer que p40 est bien une protéine intégrale transmembranaire. Une manière de le vérifier serait d'insérer différents sites consensus de N-glycosylation dans la séquence de p40 et de constater l'apparition de formes glycosylées sur gel d'acrylamide. Si c'est le cas, cela signifie que la protéine est transloquée à travers la membrane des microsomes puisque l'enzyme responsable de la glycosylation (l'oligosaccharyl transférase) se trouve sur la face luminale du réticulum endoplasmique. Ce point fera l'objet du chapitre suivant.

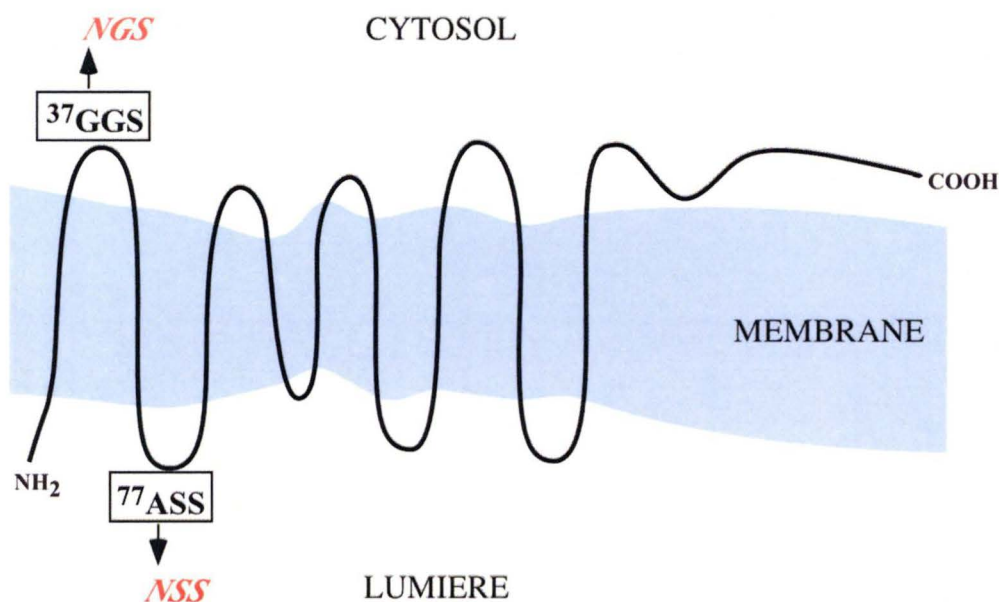


Figure 14 : Insertion de sites consensus de N- glycosylation

Des sites consensus de N-glycosylation ont été ajoutés dans les 2 premières boucles hydrophiles de p40. Selon le modèle de prédiction de TMHMM2, seule la construction A77N devrait être glycosylée.

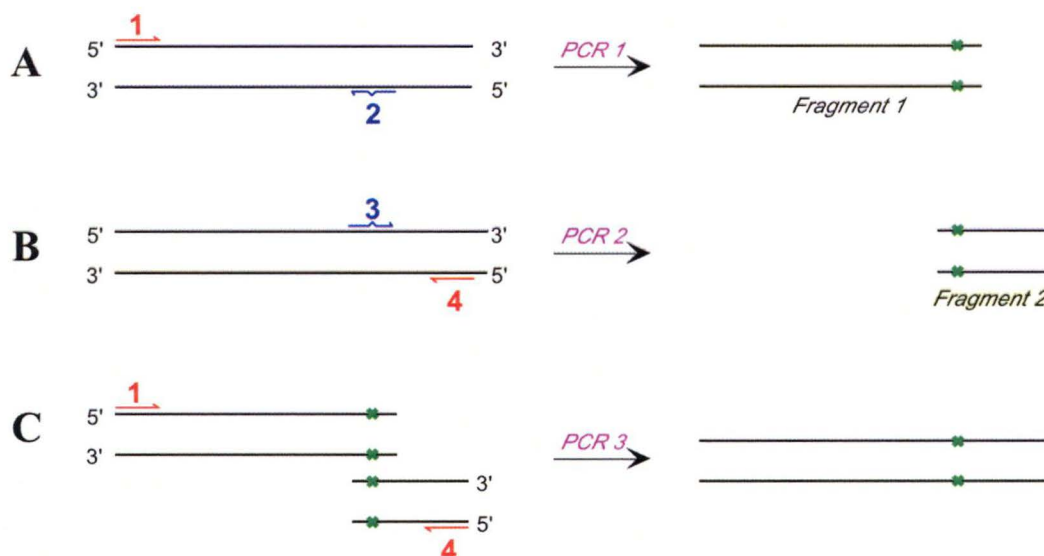


Figure 15: Principe de la mutagenèse dirigée par PCR avec recouvrement

Cette stratégie consiste à réaliser 2 réactions de PCR avec les couples d'amorces 1-2 (A) et 3-4 (B) pour donner naissance à 2 fragments (1 et 2) qui se chevauchent. Ces fragments sont ensuite utilisés comme *template* pour effectuer une troisième réaction de PCR avec les amorces 1 et 4 (C). Ce troisième fragment contient la séquence complète de l'ADNc codant pour la protéine d'intérêt avec la mutation insérée à l'endroit choisi.

2. ETUDE DE LA TOPOLOGIE MEMBRANAIRE DE P40 PAR INSERTION DE SITES CONSENSUS DE GLYCOSYLATION

L'insertion de sites consensus de glycosylation dans des régions hydrophiles a permis notamment de déterminer le nombre de segments transmembranaires du CFTR (Chang et al., 1994), une protéine dont la mutation $\Delta F508$ est responsable de la mucoviscidose (Riordan et al., 1989). Pour cela, il a été nécessaire d'insérer une séquence NxS/T dans toutes les régions hydrophiles séparant les segments transmembranaires prédits. La glycosylation de l'un de ces sites permet de conclure à la translocation de la protéine à travers la membrane microsomale, étant donné que l'oligosaccharyl transférase est une enzyme dont l'activité catalytique est associée à la face luminale du réticulum endoplasmique. Pour p40, nous avons décidé de construire 2 mutants de glycosylation (G37N et A77N) dans lesquels le site consensus de glycosylation NxS a été ajouté dans sa première ou dans sa deuxième boucle hydrophile (figure 14). Selon les modèles de prédiction, un seul des 2 mutants devrait être glycosylé puisque les sites sont disposés de part et d'autre de la membrane. Cela devrait nous permettre de donner l'orientation des 3 premiers segments transmembranaires et surtout de tester si réellement p40 est une protéine transmembranaire.

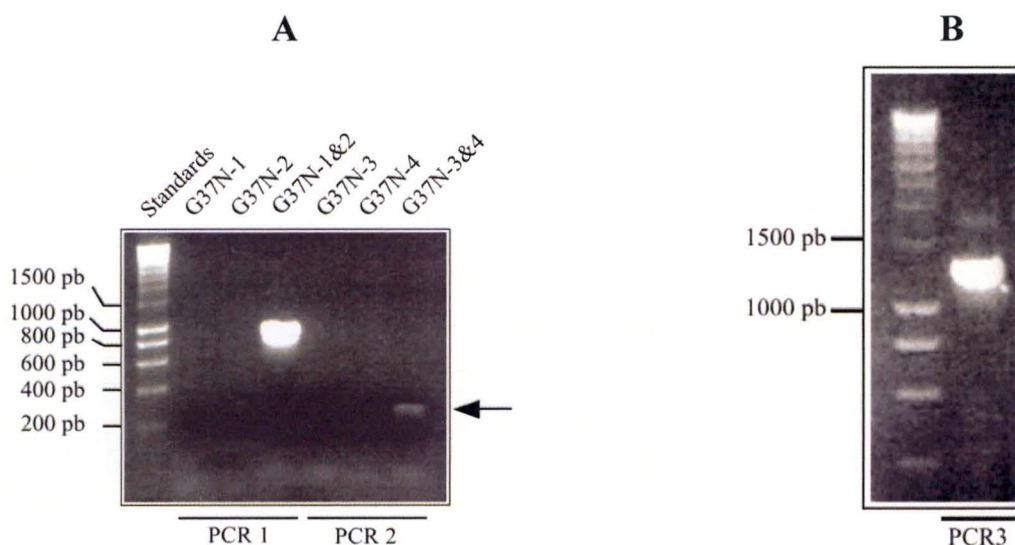
2.1. OBTENTION DE MUTANTS DE GLYCOSYLATION PAR BIOLOGIE MOLÉCULAIRE.

Les 2 mutants de glycosylation ont été obtenus par mutagenèse dirigée; le premier en remplaçant une glycine par une asparagine en position 37 (G37N) et l'autre, en remplaçant une alanine par une asparagine en position 77 (A77N). Théoriquement, les 2 séquences NGS et NSS, générées de cette façon, devraient être glycosylées efficacement si elles entrent en contact avec l'oligosaccharyl transférase (Shakin-Eshleman et al., 1996).

2.1.1. G37N

La mutation G37N a été obtenue par 3 réactions de PCR successives avec recouvrement (figure 15). Suivant cette stratégie, 4 amorces (ou oligonucléotides) sont nécessaires (Sambrook et Russel, 2001). Deux d'entre elles (1 et 4) ont une séquence parfaitement homologue à des séquences situées aux extrémités 5' de l'ADN mais sur les brins opposés. Les 2 autres (2 et 3) contiennent la mutation désirée et s'apparient avec des séquences internes des brins d'ADN. Les deux premières PCR sont réalisées avec les amorces 1 et 2 d'une part (figure 15-A) et avec les amorces 3 et 4 d'autre part (figure 15-B). Elles donnent naissance à 2 fragments d'ADN qui se chevauchent. Ces fragments sont ensuite utilisés comme matrice (*template*) lors de la troisième PCR, qui s'effectue avec les amorces 1 et 4, pour reconstituer la séquence complète de l'ADN avec la mutation désirée (figure 15-C).

Pour obtenir la construction G37N, nous avons réalisé la première PCR avec le vecteur pCMV•SPORT6 contenant la séquence nucléotidique de p40 (*template*) et les amorces G37N-1 et G37N-2. Elle a donné naissance à un fragment de 1023 paires de bases (pb) que nous pouvons visualiser sur gel d'agarose (Figures 15-A et 16-A). La deuxième PCR a été réalisée en parallèle avec les 2 autres amorces G37N-3 et G37N-4 et a donné un fragment de la taille attendue (280 pb) (figures 15-B et 16-A). Sur base de ces résultats, nous avons réalisé la troisième PCR avec les 2 fragments d'ADN, préalablement purifiés sur colonne de silice, et avec les amorces G37N-1 et G37N-4. A l'issue de cette dernière PCR, nous avons obtenu un fragment de 1286 pb (figure 15-C et figure 16-B) que nous avons purifié sur gel d'agarose.



Figures 16: Electrophorèse des fragments de PCR obtenus pour la mutation p40G37N

Après les réactions de PCR, un échantillon de chaque mixture a été solubilisé et déposé sur un gel d'agarose 1,2 %. Pour les 2 premières PCR, des contrôles ont été réalisés avec une seule des 2 amorces (A). Les PM attendus pour les 3 fragments PCR étaient, dans l'ordre, 1028, 280 et 1086 pb (B).

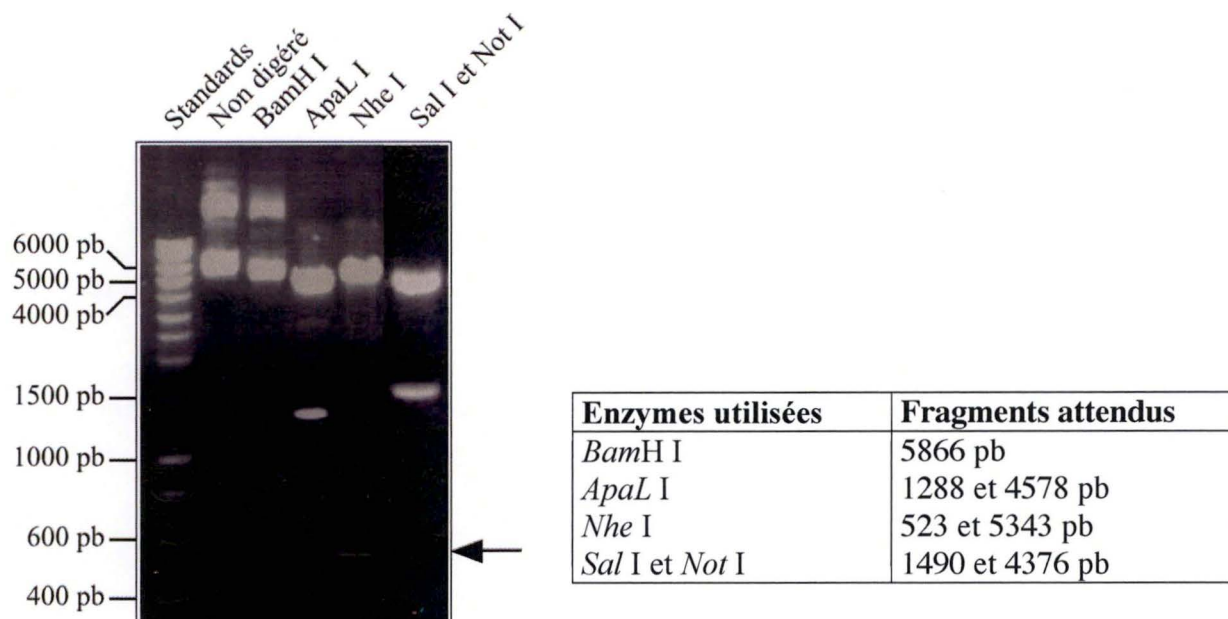


Figure 17 : Digestions contrôles sur une minipréparation d'ADN contenant la séquence de p40 G37N

Les minipréparations ont été digérées pendant une heure à 37°C avec plusieurs enzymes de restriction : *BamH* I, *ApaL* I, *Nhe* I ou *Sal* I/*Not* I. La figure montre les profils d'électrophorèse des échantillons après digestion. Le tableau reprend la taille attendue des fragments après digestion avec les différentes enzymes de restriction.

Ensuite, ce fragment de 1286 pb a été digéré par les enzymes de restriction *Sal I* et *Pvu II* afin de permettre son insertion dans le vecteur plasmidique pCMV•SPORT6, clivé par les mêmes enzymes de restriction.

Ce plasmide recombinant a ensuite été utilisé pour transformer des bactéries (*E. coli* DH11α) afin d'obtenir un grand nombre de copies par réplication de l'ADN plasmidique. Les bactéries ont été ensemencées sur des boîtes de Pétri contenant du milieu de culture gelifié (LB + agar) et de l'ampicilline afin de sélectionner les bactéries transformées. En effet, seules les bactéries transformées (qui contiennent effectivement le plasmide) peuvent se multiplier dans ce milieu sélectif puisque le plasmide pCMV•SPORT6 contient le gène de résistance à l'ampicilline.

Pour vérifier la présence de notre plasmide recombinant dans les colonies bactériennes, obtenues après une nuit d'incubation à 37°C, nous avons réalisé un premier test par PCR sur des colonies isolées. Pour confirmer nos résultats, nous avons également réalisé des digestions enzymatiques sur des minipréparations d'ADN (voir Matériel et Méthodes).

L'ADN plasmidique ainsi obtenu a été ensuite soumis à plusieurs digestions avec des enzymes de restriction qui clivent l'ADN à des sites bien spécifiques. En analysant la carte de restriction du vecteur pCMV•SPORT6 contenant la séquence de p40, on peut prévoir la taille des fragments en fonction des enzymes utilisées. Par exemple, pour vérifier la présence de p40-G37N, nous avons utilisé les enzymes de restriction *BamH I*, *ApaI*, *Nhe I*, *Sal I* et *Not I* (figure 17). La taille des fragments obtenus correspond aux prédictions.

Après avoir vérifié la présence de p40 dans le plasmide, nous avons séquencé l'ADN sur toute sa longueur à l'aide de différentes amorces. Le but était bien sûr de s'assurer que la mutation G37N est bien présente et que l'ADN polymérase n'a pas introduit de mutations indésirables pendant les différentes PCR. Le séquençage a été réalisé par le laboratoire de Neurobiologie (URPHYM, Namur), à partir d'un échantillon d'ADN purifié par chromatographie sur colonne de silice (maxipréparation d'ADN).

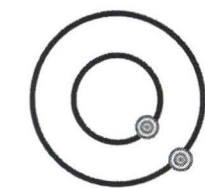
Pour nos réactions de PCR, nous avons eu recours à une ADN polymérase de grande qualité : la Pfu UltraTM high-fidelity DNA polymerase, commercialisée par Stratagène. Pourtant, outre la mutation G37N, nous avons observé trois autres mutations non désirées dans la séquence de p40. Elles provoquent la substitution d'une phénylalanine en isoleucine (en position 44), d'une glutamine en lysine (en position 83) et d'une thréonine en sérine (en position 100) (voir figure 7). Les 2 premières se trouvent théoriquement dans des boucles hydrophiles. La dernière se trouve dans un segment transmembranaire mais ne devrait pas réduire les propriétés d'ancrage de ce segment puisque la thréonine et la sérine possèdent des propriétés physico-chimiques proches. Dès lors, nous avons décidé de poursuivre l'utilisation de cette construction en supposant que ces mutations ponctuelles ne perturberaient pas l'ancrage des segments transmembranaires dans la bicouche lipidique.

2.1.2. A77N

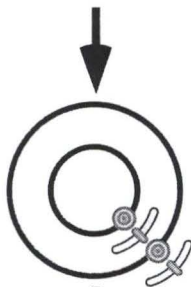
Afin d'obtenir la mutation A77N, nous avons essayé un kit de mutagenèse dirigée déjà utilisé dans les unités de recherche en biologie moléculaire (URBM) et biologie cellulaire (URBC) des FUNDP.

➤ **Mutagenèse dirigée avec le kit de Stratagène**

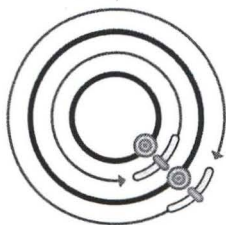
Ce kit « QuikChange site-directed mutagenesis kit » permet d'introduire en une seule PCR une mutation dans un plasmide contenant la protéine d'intérêt. La procédure de base consiste à utiliser un vecteur plasmidique contenant la protéine d'intérêt (p40 dans pCMV-SPORT6) et



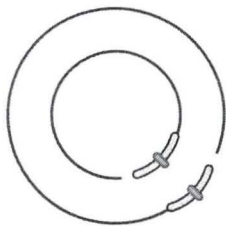
Plasmide contenant la séquence d'intérêt.



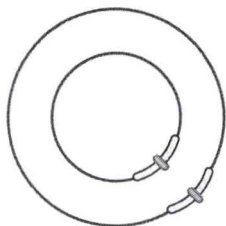
PCR avec le plasmide et des amorces contenant la mutation désirée qui s'apparient avec les séquences complémentaires situées sur le plasmide.



L'ADN polymérase assure la synthèse du plasmide muté.



Digestion : la *Dpn I* digère l'ADN parental méthylé.



Transformation : les plasmides mutés sont introduits par choc thermique dans des bactéries super compétentes.

Figure 18 : Principe de mutagenèse dirigée avec le kit de Stratagène

- Cible pour la mutation
- ADN plasmidique parental
- Amorces contenant la mutation désirée au milieu de leur séquence
- ADN plasmidique muté

deux amorces contenant la mutation désirée en position centrale (figure 18). Durant les cycles PCR, les oligonucléotides viennent s'apparier sur la séquence complémentaire située sur un des 2 brins d'ADN. L'ADN polymérase (*pfu Turbo DNA Polymerase*) assure la synthèse des 2 brins d'ADN. L'incorporation des oligonucléotides permet la formation de plasmides mutés avec des interruptions de séquence à différents niveaux. L'enzyme de restriction *Dpn I*, une enzyme qui est spécifique de l'ADN méthylé et hémiméthylé, est ensuite ajoutée dans la mixture de PCR pour digérer l'ADN parental. Les ADN isolés à partir de la plupart des souches de *E. coli* sont effectivement dam méthylés et donc sensibles à la digestion avec *Dpn I*. Ensuite, les plasmides mutés sont introduits dans des bactéries XL1-blue par choc thermique pour y être réparés et répliqués. Les bactéries sont alorsensemencées sur des boîtes de Pétri contenant du milieu LB et de l'ampicilline afin de sélectionner les bactéries ayant intégré le plasmide recombinant.

Malheureusement, après 3 essais, nous n'avons obtenu qu'une seule colonie bactérienne et le plasmide purifié ne renfermait pas la mutation A77N. Nous avons alors essayé d'obtenir la mutation désirée par la méthode classique des 3 PCR, décrite précédemment.

➤ Méthode classique

La procédure est exactement la même que celle décrite pour la mutation G37N, mais nous avons utilisé une autre ADN polymérase (la *Pfu Turbo DNA polymerase*) et d'autres oligonucléotides pour introduire la mutation A→N en position 77. Cette fois, le séquençage n'a pas révélé la présence d'autres mutations que la substitution désirée.

2.2. EXPRESSION IN VITRO DES MUTANTS DE GLYCOSYLATION

2.2.1. Traduction in vitro en absence de microsomes

Dans les premières expériences de traduction *in vitro* avec les mutants de glycosylation, le niveau d'expression protéique était relativement faible. Aussi avons-nous décidé d'ajouter une coiffe (m⁷G(5')ppp(5')G) sur l'extrémité 5' de l'ARN pour faciliter la fixation de la sous-unité 40S du ribosome sur le transcrit primaire par l'intermédiaire du facteur d'initiation de la transcription eIF4.

Les transcrits de nos 2 mutants de glycosylation et de p40-WT ont été traduits dans un lysat de réticulocytes en absence de microsomes pour la vérification de leur taille. Dans l'expérience présentée à la figure 19, après la traduction *in vitro*, les échantillons ont été solubilisés dans du tampon PBS contenant du Triton 1 % et des inhibiteurs de protéases. Ensuite, les différentes formes de p40 ont été immunoprécipitées avec un anticorps spécifique et de la protéine A-sépharose avant d'être soumises à une électrophorèse en présence de SDS. Nos résultats montrent que les 3 formes de p40 sont reconnues par l'anticorps et que les 2 mutants de glycosylation ont le même poids moléculaire apparent que p40-WT. Cela corrobore les résultats du séquençage qui indiquaient que la séquence des 2 mutants de glycosylation ne renfermait pas de codon stop prématuré. Cela prouve également que le cadre de lecture a été respecté.

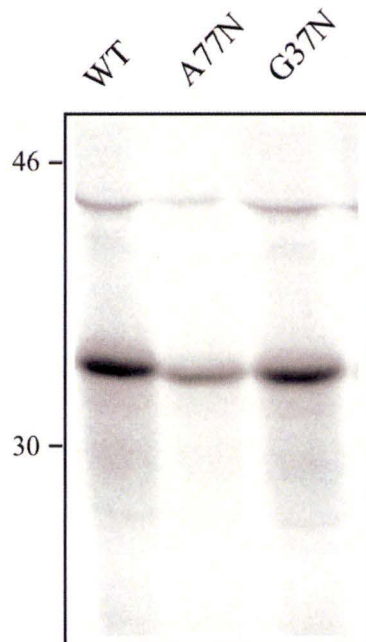


Figure 19: Traduction *in vitro* des 3 formes de p40 en absence de microsomes

L'ARN codant pour p40-WT, p40-G37N ou p40-A77N a été ajouté à une mixture de traduction contenant un lysat de réticulocytes, des acides aminés, de la [³⁵S] méthionine. Après 1 h d'incubation à 30°C, les échantillons ont été immunoprécipités avec l'anticorps anti-p40, solubilisés puis déposés sur un gel d'acrylamide 12% contenant du SDS.

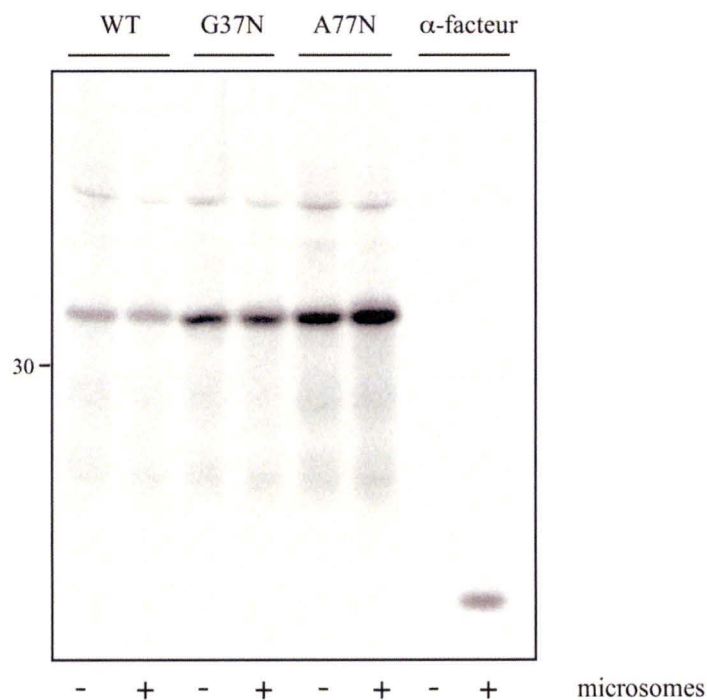
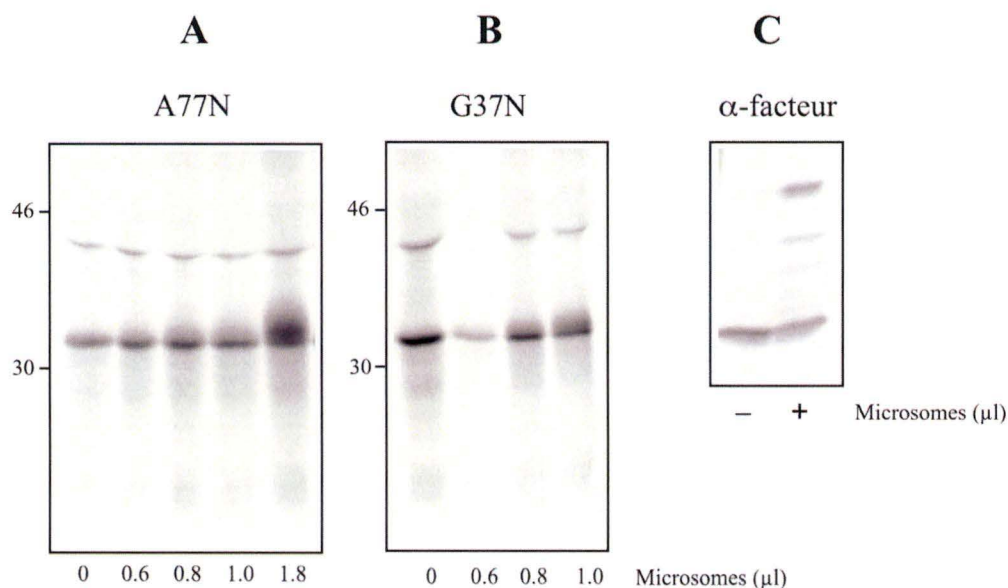


Figure 20 : Traduction *in vitro* des 3 formes de p40 en absence ou en présence de microsomes

Après transcription *in vitro*, les ARN codant pour les 3 formes de p40 ont été ajoutés à des mixtures de traduction contenant un lysat de réticulocytes, des acides aminés, de la [³⁵S] méthionine et éventuellement des microsomes (Promega). Après 1 h d'incubation à 30°C, les protéines p40 ont été immunoprécipitées et soumises à une électrophorèse sur gel d'acrylamide 12 % en présence de SDS.



Figures 21: Traduction *in vitro* des 2 mutants de glycosylation avec différentes quantités de microsomes

L'ARN codant pour p40-A77N (A) ou pour p40-G37N (B) a été ajouté à une mixture de traduction contenant un lysat de réticulocytes, des acides aminés, de la [35 S] méthionine et des quantités croissantes de microsomes (Promega). Après 1 h d'incubation à 30°C, les protéines p40 ont été immunoprécipitées et soumises à une électrophorèse sur gel d'acrylamide 12 % en présence de SDS. L' α -facteur (C) qui sert de contrôle de glycosylation, a été directement déposé sur gel.

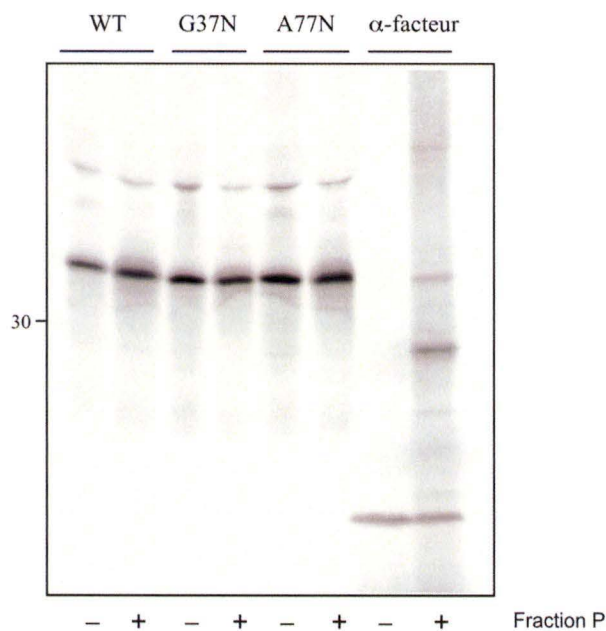


Figure 22 : Traduction *in vitro* en absence ou présence de microsomes de foie de rat

Les ARN ont été ajoutés à des mixtures de traduction *in vitro* contenant un lysat de réticulocytes, des acides aminés, de la [35 S] méthionine et éventuellement des microsomes, provenant d'une fraction P de foie de rat. Après 1 h d'incubation à 30°C, les protéines p40 ont été immunoprécipitées et soumises à une électrophorèse sur gel d'acrylamide 12 % en présence de SDS. L' α -facteur, utilisé comme contrôle de la glycosylation, a été directement déposé sur gel.

2.2.2. Traduction *in vitro* en présence de microsomes

Après avoir constaté que les mutants de glycosylation étaient correctement exprimés dans un lysat de réticulocytes, nous avons analysé leur glycosylation éventuelle lorsque la traduction *in vitro* se déroule en présence de microsomes d'origine commerciale (Promega). Les résultats sont présentés à la figure 20. Aucun des deux mutants n'est glycosylé en présence de microsomes, dans les conditions recommandées par le fournisseur. Notons cependant, que dans cette expérience particulière, l' α -facteur utilisé comme contrôle de la glycosylation, ne se présente que sous sa forme précurseur non glycosylée. Nous ne pouvons donc pas tirer de conclusions sur base de cette expérience.

Nous avons refait l'expérience avec A77N (figure 21-A) et G37N (figure 21-B) en utilisant des quantités croissantes de microsomes. Cette fois-ci, l' α -facteur est glycosylé efficacement : environ 50 % des protéines présentent 3 chaînes d'oligosaccharides (figure 21-C). Par contre, nous ne voyons pas apparaître de chaînes polypeptidiques supplémentaires ni avec le mutant A77N ni avec le mutant G37N et ce, quelle que soit la quantité de microsomes utilisée. La fine bande qui migre plus lentement dans le gel (PM ~43 kDa) ne correspond pas à une forme glycosylée puisqu'elle apparaît même en absence de microsomes (figures 20 et 21). En fait, elle apparaît chaque fois que les protéines p40 sont immunoprécipitées. C'est donc une bande artéfactuelle dont la présence est liée à l'utilisation des anticorps anti-p40.

Etant donné que le niveau de glycosylation de l' α -facteur n'est pas toujours satisfaisant, nous avons refait la traduction *in vitro* en remplaçant les microsomes de Promega par une fraction microsomale (P) de foie de rat. La fraction P, obtenue à partir d'un homogénat de foie de rat grâce à un protocole de sédimentation différentielle (De Duve et al., 1955), renferme des endosomes, des vésicules dérivant du réticulum endoplasmique, du Golgi et de la membrane plasmique. Elle est obtenue en centrifugeant l'extrait cellulaire restant, à 135.000 g pendant 10 min. Le culot ainsi obtenu est resuspendu dans un petit volume de saccharose 0,25 M contenant un inhibiteur de ribonucléases.

La figure 22 nous montre les résultats obtenus après traduction *in vitro*, en absence (-) et en présence (+) de fraction P pour les protéines p40-WT, p40-G37N, p40-A77N. Il apparaît d'abord que l' α -facteur est glycosylé mais que son degré de glycosylation n'est pas plus élevé que celui obtenu avec les microsomes de Promega (voir figure 20). D'autre part, p40-WT et les 2 mutants porteurs des sites de glycosylation potentielle, immunoprécipitées avec l'anticorps anti-p40, ne laissent pas apparaître de formes glycosylées lorsqu'ils sont traduits en présence de microsomes.

Au vu de ces résultats, nous nous sommes demandés si notre système de traduction *in vitro* était suffisamment équipé (en chaperonnes, notamment) pour permettre l'insertion membranaire et par conséquent, la glycosylation d'une protéine aussi atypique que p40. C'est pourquoi avec l'aide de Marielle Boonen nous avons transfecté des cellules COS avec nos différentes constructions pour voir si dans les cellules eucaryotes, p40 et les mutants G37N ou A77N étaient glycosylés. Les cellules ont été marquées métaboliquement avec de la [35 S] méthionine, pendant un temps relativement long (4h) afin de s'assurer qu'une quantité suffisante de protéines néo-synthétisées ait pu atteindre une maturation complète dans la voie de la biosynthèse. Ensuite, les cellules ont été homogénéisées et, une fraction membranaire a été préparée par centrifugation différentielle. Finalement, les membranes lysées ont été utilisées pour l'immunoprécipitation et déposées sur un gel d'acrylamide.

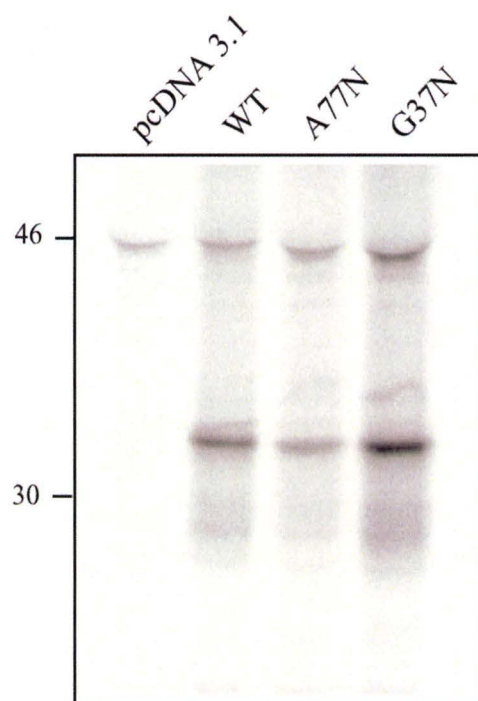


Figure 23 : Expression des 3 formes de p40 dans des cellules COS transfectées

Les cellules COS ont été transfectées avec les 3 formes de p40 (p40-WT, p40-A77N et p40-G37N) ou avec un plasmide sans insert (pcDNA 3.1). Après un marquage métabolique de 4 h avec la [^{35}S] méthionine, les cellules ont été homogénéisées avec un Dounce et une fraction membranaire a été obtenue par centrifugation différentielle. Les protéines p40 ont ensuite été immunoprécipitées et déposées sur un gel d'acrylamide 12 %.

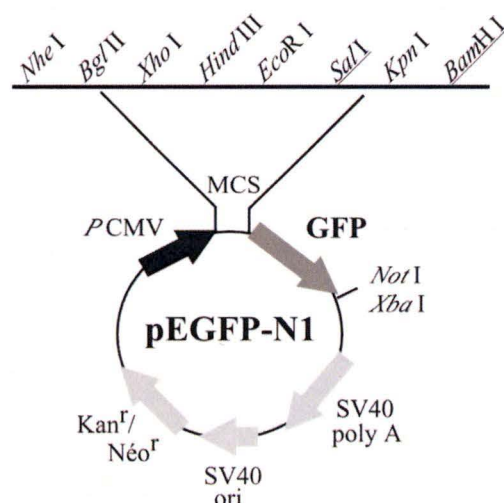
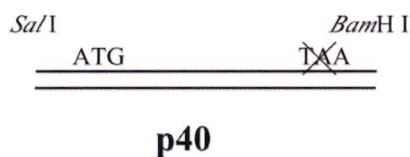
Les résultats obtenus avec les cellules COS transfectées (figure 23) confirment les résultats obtenus avec les lysats de réticulocytes (figures 21 et 22). En effet, p40 présente le même poids moléculaire apparent. De plus, aucune forme de p40 (WT ou mutée) n'est glycosylée. Cette expérience ne remet donc pas en question l'utilisation d'un système de traduction *in vitro* pour l'étude de la topologie membranaire de cette protéine particulière.

Plusieurs hypothèses pourraient être avancées pour expliquer ce résultat. Il est d'abord possible que les sites consensus de glycosylation que nous avons choisis ne soient pas reconnus par l'oligosaccharyl transférase. Il est généralement admis que le X dans la séquence NXS/T peut être un acide aminé quelconque, sauf une proline parce que celle-ci forme un coude dans la structure secondaire de la protéine (Shakin-Eshleman et al., 1996). Cependant, des expériences ont montré que la présence d'acides aminés trop encombrants comme le tryptophane, la leucine, la phénylalanine et la tyrosine, ou chargés négativement comme l'acide aspartique (Asp) et l'acide glutamique (Glu) pouvait réduire le niveau de glycosylation d'une chaîne polypeptique recombinante (Shakin-Eshleman et al., 1996). Dans cette étude, les séquences NGS et NSS que nous avons sélectionnées se trouvent parmi les séquences les plus efficacement glycosylées. Cette première hypothèse nous paraît donc peu probable.

Ensuite, il se pourrait que la distance entre ces sites consensus de glycosylation et les segments transmembranaires situés en amont et en aval soit trop petite. Des travaux ont montré que la distance minimale entre une séquence NXS/T et un segment membranaire devait être de 13-15 acides aminés (Nilsson et von Heijne, 1993). Toutefois, il est fréquent de rencontrer une distance plus courte dans les protéines polytopiques. Par exemple, dans le canal chlore CFTR, la distance entre le second site consensus de N-glycosylation et le huitième segment transmembranaire est de 11 acides aminés (Riordan et al., 1989) ce qui n'empêche pas la glycosylation. De plus, dans une forme mutante du CFTR, naturellement présente chez un patient atteint de mucoviscidose, le CFTR T908N, la protéine est glycosylée sur 3 asparagines dont la dernière se trouve juste en amont d'un segment transmembranaire (Hammerle et al., 2000). Cette glycosylation supplémentaire pourrait être due au mauvais ancrage du segment transmembranaire sous-jacent qui contient un acide aminé chargé négativement (Carveth et al., 2002). Dans le cas de la construction G37N, selon le modèle de prédiction proposé par le logiciel TMHMM2 (figure 7), les distances entre le site consensus NGS et les segments transmembranaires potentiels situés de part et d'autre sont respectivement de 6 et 7 acides aminés. Par contre, dans le cas de la construction A77N, la boucle hydrophile étant plus grande, les distances sont de 9 et 10. Toutefois, cette distance est peut-être insuffisante pour permettre l'accès du site actif de l'oligosaccharyl transférase sur l'asparagine. Pour contourner ce problème, nous pourrions envisager d'ajouter des acides aminés supplémentaires pour agrandir la taille des boucles hydrophiles, ce qui aurait toutefois comme inconvénient de risquer d'influencer la topologie réelle de p40 dans la membrane des microsomes.

Quoiqu'il en soit, l'absence de glycosylation n'est probablement pas due à l'utilisation de notre système de traduction *in vitro* puisque des résultats identiques ont été obtenus dans les cellules COS transfectées avec l'ADNc de p40-WT, de p40-G37N ou de p40-A77N. Dans cette expérience, la protéine p40 a été immunoprécipitée à partir d'une fraction membranaire (la fraction MLP) obtenue par centrifugation différentielle. Ceci suggère que la protéine p40 est associée à un compartiment membranaire. Par conséquent, l'absence de glycosylation ne devrait pas résulter d'un problème de translocation ou d'insertion de p40 dans la membrane du réticulum endoplasmique où se déroule sa synthèse.

A



B

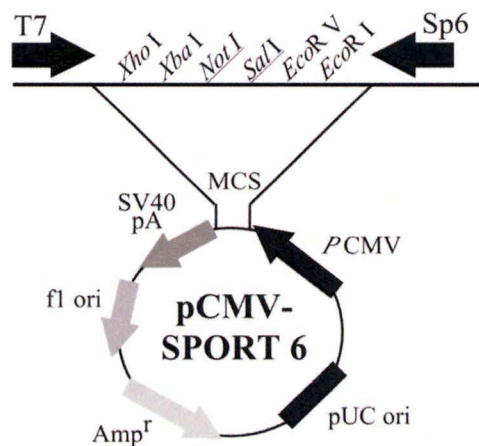
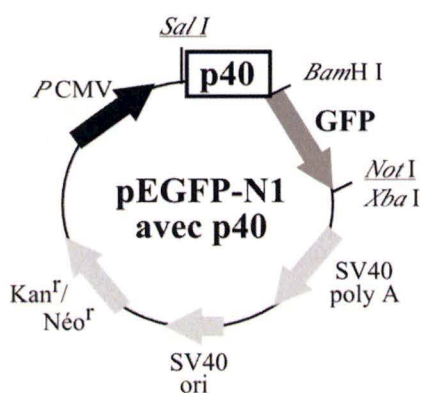


Figure 24 : Stratégie utilisée pour obtenir la construction p40-GFP

A. La séquence de p40 a été amplifiée par PCR avec 2 amorces, choisies de façon à introduire un site *Bam*HI et à supprimer le codon stop à l'extrémité 3'. Ce fragment, digéré avec *Sal*I et *Bam*HI, a été inséré dans le vecteur pEGFP-N1 par la T4 ADN ligase.

B. La séquence de p40, couplée à celle de la GFP, a été sous-clonée dans le vecteur pCMV•SPORT 6 en utilisant les sites de restriction *Sal*I et *Not*I.

3. ETUDE DE LA TOPOLOGIE MEMBRANAIRE DE P40 PAR DIGESTION PROTÉOLYTIQUE

Outre la méthode d'insertion de sites consensus de N-glycosylation dans les boucles hydrophiles, il existe une autre approche pour étudier la topologie membranaire d'une protéine. Elle consiste à insérer un épitope (*tag*) à l'une ou l'autre extrémité de la protéine d'intérêt, à exprimer cette protéine *in vitro* en présence de microsomes et à ajouter une protéase (souvent la protéinase K ou la trypsine) dans la mixture de traduction (Tector et Hartl, 1999; Raab-Graham et al., 1999). La protéase clive la protéine en différents fragments. Seuls les segments transmembranaires et les boucles luminales hydrophiles résistent à l'activité protéolytique parce qu'ils sont protégés par la membrane. Si le fragment qui renferme l'épitope se trouve à l'intérieur des microsomes, il est possible de l'immunoprécipiter avec un anticorps spécifique. Par contre, si ce fragment se trouve à l'extérieur des microsomes, l'épitope est digéré par la protéase et il n'est plus reconnu par l'anticorps. Il est possible d'aborder le problème de 2 façons, soit en construisant 2 protéines chimériques différentes avec chacune le même épitope inséré à l'extrémité N- ou C-terminale, soit en construisant une protéine avec des épitopes différents à chaque extrémité. Nous avons choisi la première approche et nous avons greffé la GFP (pour *Green Fluorescent Protein*) en position N- ou C-terminale de p40. Cette stratégie a déjà été utilisée pour étudier la topologie membranaire de la Dephrine, une protéine transmembranaire découverte chez *Drosophila melanogaster* (Bossing et Brand, 2002). Les constructions p40-GFP (où la GFP est en position C-terminale) et GFP-p40 (où la GFP est en position N-terminale) présentent deux avantages. D'une part, elles peuvent être facilement visualisées sur un gel d'acrylamide classique (Tris-Glycine) puisque la GFP présente un poids moléculaire de 27 kDa. D'autre part, la GFP étant une protéine autofluorescente, les constructions p40-GFP et GFP-p40 pourront être utilisées ultérieurement pour étudier la localisation intracellulaire de p40 par microscopie fluorescente confocale.

3.1. OBTENTION DES PROTÉINES CHIMÉRIQUES

3.1.1. P40-GFP

La construction de p40-GFP a nécessité 2 étapes successives : d'abord le sous-clonage de p40 dans le vecteur pEGFP-N1; ensuite, le sous-clonage de p40, couplée à la GFP, dans le vecteur pCMV•SPORT6 qui dispose d'un promoteur SP6, indispensable à la transcription *in vitro* (figure 24).

➤ Transfert du cDNA de p40 dans le vecteur pEGFP-N1

Le vecteur pEGFP-N1 (Clontech) permet de coupler la GFP au niveau de l'extrémité C-terminale d'une protéine, à condition de supprimer le codon stop de la protéine d'intérêt et de rester dans le même cadre de lecture.

Nous avons tout d'abord amplifié p40 en lui insérant un site *Bam*H I et en lui enlevant son codon stop au niveau de son extrémité 3'. Ensuite, nous avons digéré le fragment obtenu par PCR ainsi que le vecteur pEGFP-N1 avec les enzymes *Sal* I et *Bam*H I. Finalement, après ligation et transformation, nous avonsensemencé les bactéries sur des boîtes de Pétri contenant du milieu LB et de la kanamycine (50 µg/ml). Des digestions enzymatiques ont été réalisées sur des minipréparations d'ADN et nous avons fait une maxipréparation sur une des

A



B

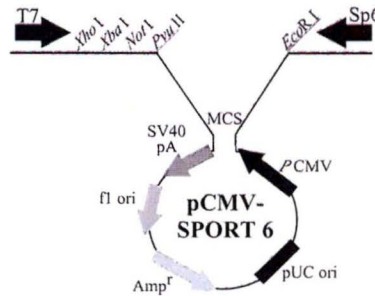
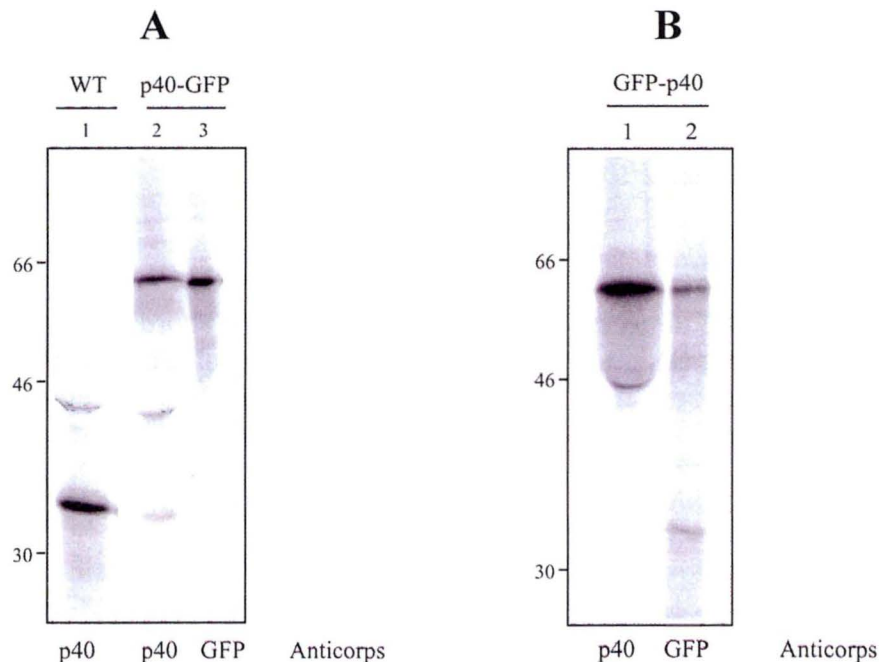


Figure 25 : Stratégie utilisée pour obtenir la construction GFP-p40

A. Les séquences de p40 et de la GFP ont été amplifiées par PCR avec des amorces, choisies de façon à introduire un site *Xho* I ou un site *Eco* R I à leurs extrémités 5' respectives.

B. Ces fragments de PCR ont été digérés avec *Eco* R I-*Xho* I (pour la GFP) et *Xho* I-*Pvu* II (pour p40) et insérés simultanément dans le vecteur pCMV•SPORT6, clivé avec les enzymes de restriction *Eco* R I et *Pvu* II.



Figures 26 : Immunoprécipitation de p40-WT, p40-GFP et GFP-p40 après traduction *in vitro*

Après la traduction *in vitro*, la protéine p40-WT (**A**) a été immunoprécipitée avec l'anticorps anti-p40, tandis que les protéines p40-GFP (**A**) et GFP-p40 (**B**) ont été immunoprécipitées avec un anticorps anti-p40 ou un anticorps anti-GFP. Les échantillons ont ensuite été soumis à une électrophorèse sur un gel d'acrylamide de 12 (**A**) ou 10 % (**B**).

colonies présentant le profil de digestion attendu, sur base de la carte de restriction. Le séquençage de cette construction a révélé que p40 était bien couplée à la GFP et que les séquences codant pour les 2 protéines se trouvaient dans le même cadre de lecture.

➤ **Sous clonage de p40-GFP dans pCMV•SPORT6**

Comme le vecteur pEGFP-N1 ne possède pas de promoteur SP6 ou T7 permettant sa transcription *in vitro*, nous avons sous-cloné la séquence de p40-GFP dans pCMV•SPORT6. Pour cela, nous avons utilisé les sites *Sal* I et *Not* I présents aux extrémités de p40-GFP et dans le site de clonage de pCMV•SPORT6.

3.1.2. GFP-p40

Pour obtenir la construction GFP-p40, nous avons suivi une stratégie différente: nous avons choisi d'insérer la GFP directement dans pCMV•SPORT6, en amont du codon start de p40 (figure 25). Pour cela, nous avons amplifié la séquence de la GFP, présente dans le vecteur pEGFP-C1 avec un oligo sens (CS2) contenant un site *Eco*R I à son extrémité 5' et un oligo antisens (CaS2) parfaitement homologue (voir Matériel & Méthodes). Grâce à cela, nous avons pu digérer le fragment PCR avec *Eco*R I et *Xho* I et l'insérer dans le vecteur pCMV•SPORT6 ouvert avec les enzymes de restriction *Eco*R I et *Sal* I. La ligation n'a pas posé de problème puisque les extrémités produites par les enzymes *Xho* I et *Sal* I sont compatibles.

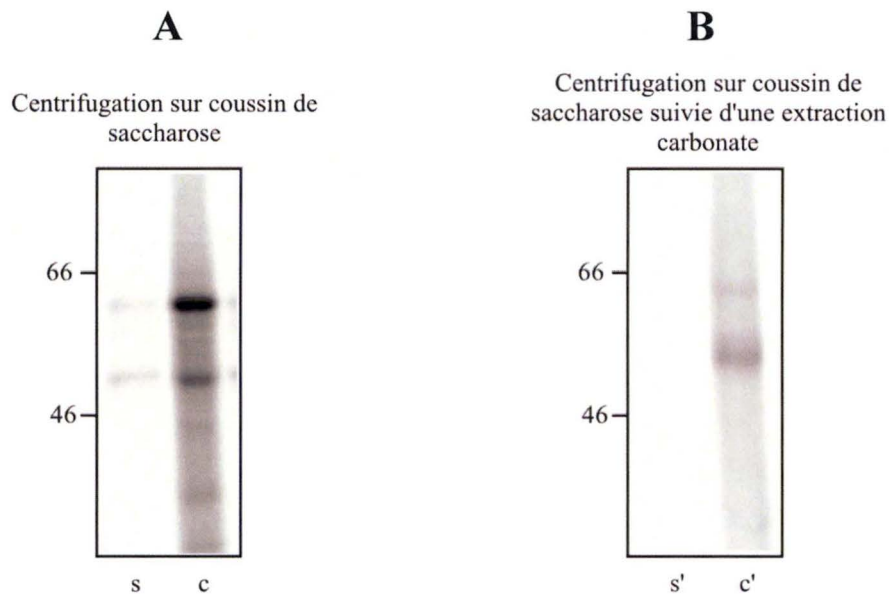
Après ligation et transformation, les fragments d'ADN obtenus lors des digestions contrôles, effectuées sur les minipreps, avaient la taille attendue. Toutefois, le séquençage a révélé que la GFP n'était pas en phase avec p40.

Nous nous sommes alors tournés vers une autre stratégie. Nous avons refait une PCR pour amplifier la GFP avec un site *Eco*R I à l'extrémité 5' et *Xho* I à l'extrémité 3'. Parallèlement à cela, nous avons introduit un site *Xho* I dans la séquence de p40, juste en amont du codon start. Ensuite, nous avons inséré simultanément les 2 fragments de PCR, digérés avec les enzymes de restriction appropriés, dans le vecteur pCMV•SPORT6, ouvert avec *Eco*R I et *Pvu* II. Cette approche nous a permis d'obtenir la construction souhaitée, confirmée par séquençage.

3.2. TRADUCTION IN VITRO DES PROTÉINES CHIMÉRIQUES

Comme le séquençage de l'ADN codant pour les protéines chimériques p40-GFP est GFP-p40 ne laissait apparaître aucune mutation, ni de problème de cadre de lecture, nous avons exprimé ces protéines dans un lysat de réticulocytes.

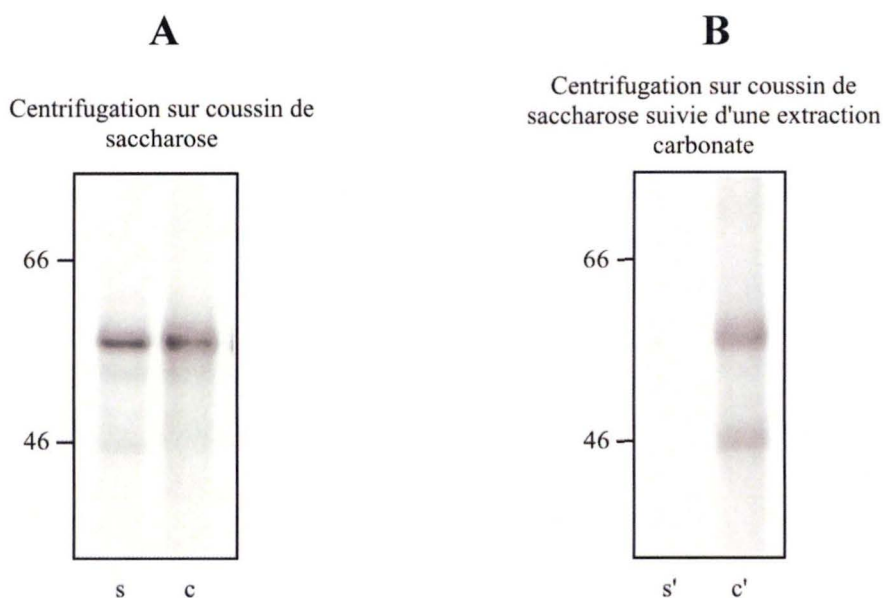
Les figures 26 A-B nous montrent le résultat de deux traductions *in vitro* réalisées en absence de microsomes : l'une montre p40-WT et p40-GFP (figure 26-A) tandis que l'autre montre GFP-p40 (figure 26-B). Après traduction, les protéines ont été immunoprécipitées soit avec l'anticorps anti-p40 qui reconnaît un peptide interne de cette protéine, soit avec un anticorps dirigé contre la GFP (figure 26-A piste 3, figure 26-B piste 2) afin de prouver l'identité des 2 protéines chimériques. Comme précédemment (voir figure 10), p40-WT présente un PM apparent d'environ 33 kDa (figure 26-A, piste 1).



Figures 27: Association membranaire de GFP-p40 dans une fraction P de foie de rat, fraîchement préparée

A. Les microsomes ont été sédimentés par centrifugation sur coussin de saccharose 1 M (135.000 g, pendant 30 min). Ensuite, le culot membranaire (c) a été solubilisé dans du SDS.

B. Un culot membranaire, obtenu après centrifugation des microsomes sur coussin de saccharose, a été incubé en présence de Na_2CO_3 0.1 M pH 11.5. Après 30 min d'incubation sur la glace, il a été centrifugé à 116.500 g pendant 2 h. Les protéines encore associées aux membranes (c') ont été directement solubilisées dans du SDS 2%. Les protéines GFP-p40, contenues dans les surnageants (s et s') ont été immunoprécipitées avec l'anticorps anti-p40.



Figures 28: Association membranaire de GFP-p40 dans une fraction P de foie de rat décongelée

Les échantillons ont été préparés comme cela a été décrit dans la légende de la figure 27 mais, dans ce cas, les protéines GFP-p40, contenues dans les surnageants (s et s') et les culots (c et c') ont été immunoprécipitées avec l'anticorps anti-GFP.

P40-GFP se trouve à un PM proche de 60 kDa, ce qui correspond à l'addition de la GFP (239 acides aminés), de 7 acides aminés entre les 2 protéines et de 26 acides aminés supplémentaires entre la fin de la séquence codante de la GFP et le codon stop (soit 30,1 kDa théoriques supplémentaires par rapport à p40-WT). P40-GFP est immunoprécipitée avec les 2 anticorps (figure 26-A, pistes 2 et 3), ce qui montre que p40 et la GFP sont correctement traduits.

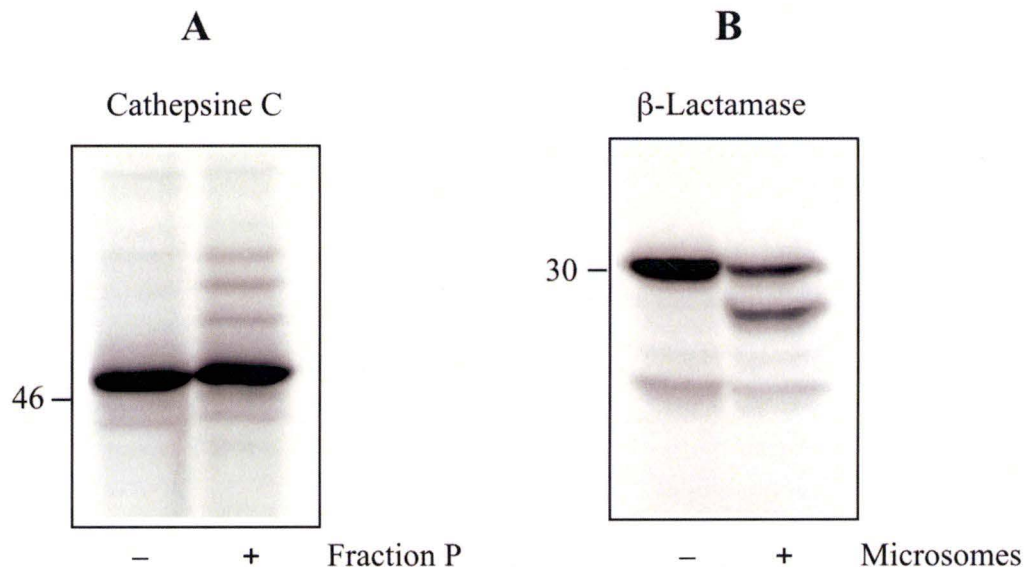
Dans la construction GFP-p40, p40 et la GFP sont aussi correctement traduites car elles sont reconnues par leurs anticorps respectifs (figure 26-B, pistes 1 et 2). Cependant, cette protéine chimérique présente un PM légèrement inférieur à celui de p40-GFP. Ceci s'explique par le fait que, dans le vecteur pEGFP-C1 (vecteur d'où provient la GFP), la séquence de la GFP est interrompue juste avant le codon stop pour permettre l'insertion d'un ADN étranger. Il n'y a pas d'acides aminés supplémentaires comme dans le vecteur pEGFP-N1. En revanche, il y a aussi 7 acides aminés entre les 2 chaînes peptidiques, ce qui aboutit à une différence de 246 acides aminés par rapport à p40-WT, soit une différence de poids moléculaire théorique de 27,3 kDa. La différence de poids moléculaire entre p40-GFP et GFP-p40 sera plus apparente dans les expériences suivantes.

L'addition de la protéine GFP à l'extrémité C-terminale de p40 ne devrait pas influencer la reconnaissance de la partie N-terminale de p40 par la particule SRP et par conséquent, la translocation de la protéine à travers la membrane des microsomes. Par contre, la présence de la GFP à l'extrémité N-terminale de p40 pourrait interférer avec l'insertion membranaire de la protéine chimérique. C'est pourquoi, nous avons réalisé une extraction au carbonate à pH 11.5 après traduction *in vitro* de la construction GFP-p40, en présence de microsomes de foie de rat.

Dans la première expérience, nous avons utilisé des microsomes de foie de rat fraîchement préparés pour permettre l'insertion de la protéine dans la membrane. Ensuite, nous avons sédimenté les microsomes par centrifugation sur coussin de saccharose (figure 27-A). Les protéines p40 contenues dans le surnageant ont été immunoprécipitées avec l'anticorps anti-p40 tandis que le culot a directement été solubilisé dans du SDS. Dans ces conditions, 2 bandes de poids moléculaire très différent apparaissent sur le gel, presque exclusivement dans le culot membranaire (c). Seule la bande supérieure possède le PM attendu de la protéine GFP-p40 entière. Après extraction au carbonate, ces 2 bandes sont toujours associées au culot membranaire mais la bande supérieure est nettement moins visible que la bande inférieure (c') (figure 27-B).

La disparition partielle de la bande supérieure pourrait être due à une mauvaise solubilisation de la protéine chimérique dans du SDS. C'est pourquoi nous avons recommencé l'expérience en solubilisant les membranes avec du Triton 1 % et en immunoprécipitant avec l'anticorps anti-GFP. Les résultats sont montrés à la figure 28. Dans cette expérience, nous constatons une proportion non négligeable de la GFP-p40 dans le surnageant (s) après centrifugation sur coussin de saccharose (figure 28-A). Ceci résulte probablement de la dégradation partielle des membranes microsomales, microsomes qui cette fois ont été utilisés après congélation et décongélation. Malgré tout, la proportion qui se retrouve dans le culot membranaire (c), reste accrochée aux membranes après extraction au carbonate (c') (figure 28-B). Ici aussi, nous trouvons 2 bandes de PM différent, mais la bande supérieure contenant la GFP-p40 est bien visible (c').

Notons que la bande inférieure est reconnue aussi bien par l'anticorps anti-p40 (figure 27-A, (s)) que par l'anticorps anti-GFP (figure 28, (c)). Il pourrait donc s'agir d'une forme tronquée de la protéine GFP-p40 ou le résultat d'une protéolyse de la partie C-terminale de p40 puisque



Figures 29 : Modifications co-traductionnelles de la cathepsine C et de la β -lactamase

La cathepsine C (**A**) et la β -lactamase (**B**) ont été exprimées dans un système de traduction *in vitro* en présence ou en absence de microsomes d'origine commerciale (**B**) ou provenant d'une fraction P de foie de rat (**A**). Après la traduction, elles ont été solubilisées dans du SDS avant d'être déposées sur un gel d'acrylamide 10 %.

l'anticorps anti-p40 reconnaît un peptide interne dans la séquence primaire de cette protéine et pas la partie C-terminale.

Si la résistance à l'extraction carbonate révèle l'insertion membranaire de la protéine comme cela est généralement admis (Bascom et al., 1999; Schlegel et al., 2001; Skach et al., 1994), ces résultats semblent indiquer que la présence de la GFP n'interfère pas avec la translocation de la construction GFP-p40 au travers de la membrane des microsomes. Par conséquent, nous avons décidé de poursuivre notre étude de la topologie membranaire de p40, en soumettant les chimères GFP-p40 ou p40-GFP à l'action de protéases après leur insertion membranaire présumée.

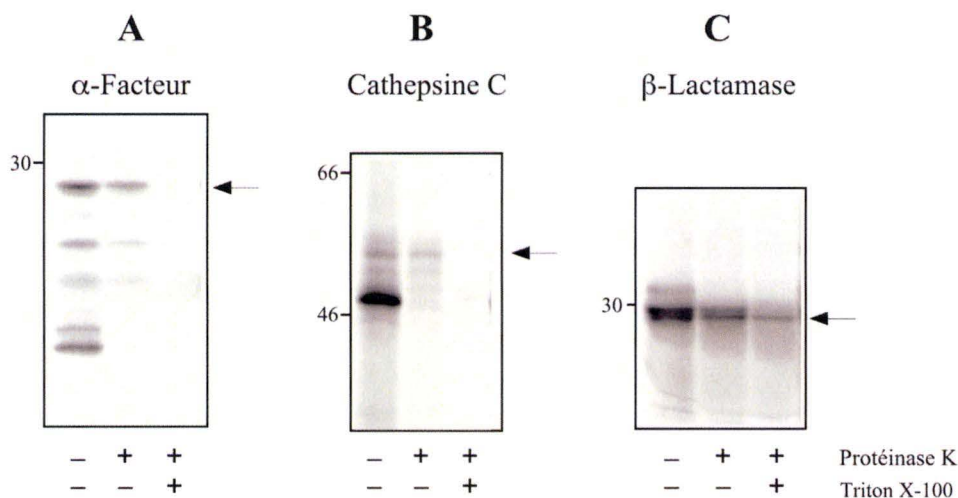
3.3. DIGESTION DES PROTÉINES CHIMÉRIQUES AVEC LA PROTÉINASE K

Comme pour p40-WT (voir figures 13 A-B), nous avons ajouté la protéinase K (PK) dans la mixture de traduction contenant les microsomes. Dans certains cas, nous avons utilisé du Triton X-100 comme contrôle dans ces expériences. En effet, si la résistance à la protéolyse résulte d'une protection conférée par la membrane des microsomes, cette protection doit être levée après solubilisation des membranes par un détergent (Tector et Hartl, 1999 ; Perara et Lingappa, 1985). Vu les difficultés rencontrées avec l'utilisation de l' α -facteur comme protéine contrôle lors des expériences précédentes (en particulier pour la glycosylation), nous avons jugé bon d'ajouter d'autres contrôles. Nous avons ainsi choisi la cathepsine C et la β -lactamase.

La cathepsine C est une protéine soluble des lysosomes, de la famille des cystéine-protéases. *In vivo*, elle est synthétisée sous forme d'un précurseur de 46,9 kDa. Lors de la translocation, son peptide signal est clivé et la chaîne polypeptidique est glycosylée sur plusieurs sites de N-glycosylation, laissant apparaître 4 polypeptides de PM compris entre 54 et 63 kDa (Mainferme et al., 1985). Comme notre laboratoire dispose du cDNA codant pour cette protéine (Santilman et al., 2002), il suffisait de faire une transcription et une traduction *in vitro* en présence de microsomes pour visualiser la protéine mature (figure 29-A). En absence de microsomes, nous observons en effet une protéine d'un PM légèrement supérieur à 46 kDa. En présence d'une fraction P de foie de rat, 3 bandes supplémentaires (de faible intensité) apparaissent. Nous n'avons pas réalisé d'expérience contrôle avec l'endoglycosidase H mais elles correspondent probablement à des formes glycosylées de la cathepsine C.

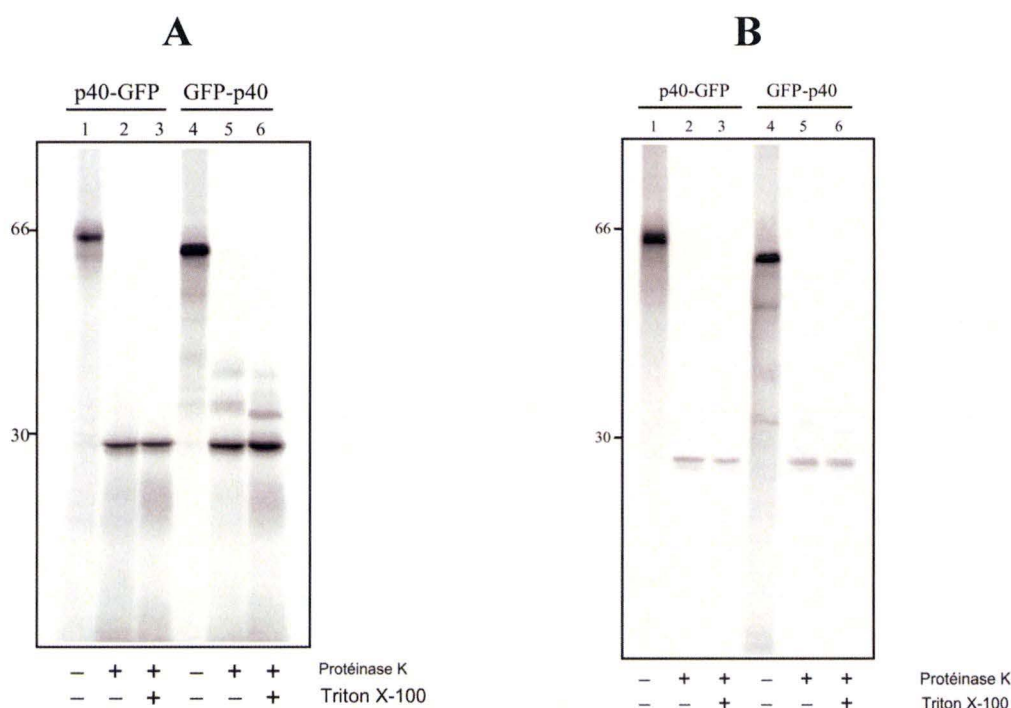
La β -lactamase, dont l'ARN est fourni par la firme Promega, est une protéine d'*E. coli* qui hydrolyse les antibiotiques de type β -lactame comme l'ampicilline. Cette protéine contient un peptide signal qui est clivé par la signal peptidase lors de sa translocation à travers la membrane du réticulum endoplasmique. La forme précurseur et la forme mature ont théoriquement un poids moléculaire respectivement de 31,5 kDa et de 28,9 kDa. Dès lors, lorsque la traduction *in vitro* est réalisée en présence de microsomes, nous devons observer une diminution du PM apparent de la β -lactamase. Celle-ci est clairement visible sur la figure 29-B.

Nous avons utilisé ces protéines pour contrôler le fonctionnement de notre système expérimental. En effet, si la membrane est intègre, les chaînes polypeptidiques obtenues après modifications co-traductionnelles doivent rester intactes après digestion avec la PK. Si cela se vérifie, cela prouverait que la PK n'a pas accès à l'intérieur des microsomes.



Figures 30 : Digestion avec la Protéinase K en présence de microsomes (Promega)

Les mixtures de traduction *in vitro* ont été incubées pendant 1 h sur la glace en présence ou absence de protéinase K (100 μ g/ml). Dans certains cas, du Triton X-100 1 % a été ajouté avant la protéinase K. La réaction a été arrêtée par addition de PMSF (5 mM). Après 10 minutes d'incubation sur la glace, un échantillon de chaque mixture a été solubilisé et déposé sur un gel d'acrylamide 12 %.



Figures 31 : Digestion avec la Protéinase K en présence de microsomes (Promega)

Les mixtures de traduction *in vitro* ont été incubées pendant 1 h sur la glace en présence ou absence de protéinase K (100 μ g/ml). Dans certains cas, du Triton X-100 1 % a été ajouté avant la protéinase K. La réaction a été arrêtée par l'addition de PMSF (5 mM). Après 10 minutes d'incubation sur glace, un échantillon de chaque mixture a été solubilisé et déposé sur un gel d'acrylamide 12 % (A). Le reste a été soumis à une immunoprécipitation avec l'anticorps anti-GFP (B).

Après traduction *in vitro*, nous avons divisé la mixture de traduction en 3 échantillons de 15 µl selon un protocole bien établi (Perara et Lingappa, 1985 ; Wo et Oswald, 1995). Le premier échantillon sert de référence. C'est le contrôle de la traduction *in vitro* en présence de microsomes. Le deuxième est digéré avec la PK (100 µg/ml) pendant 1 h sur glace. Le troisième échantillon subit le même traitement que le second mais du Triton X-100 est ajouté dans la mixture de traduction à une concentration de 1 % afin de solubiliser les membranes. Après le traitement, un tiers des échantillons est directement soumis à une SDS-PAGE.

Les figures 30 (A, B et C) nous montrent les résultats obtenus suite à ce traitement avec nos différents contrôles. En ce qui concerne l' α -facteur (figure 30-A) et la cathepsine C (figure 30-B), nous constatons que l'intensité des bandes correspondant aux protéines partiellement ou complètement glycosylées, est légèrement plus faible dans les échantillons traités à la PK (pistes 2) que dans les échantillons non traités (pistes 1). Toutefois, cette résistance contraste avec le sort des protéines précurseurs, totalement hydrolysées par la PK du fait de leur localisation à l'extérieur des microsomes. Comme attendu, en présence de Triton, toutes les protéines sont dégradées, ce qui semble indiquer que les formes glycosylées sont effectivement protégées par les membranes.

Pour ce qui est de la β -lactamase (figure 30-C), nous constatons aussi, après digestion à la PK, une diminution d'intensité de la bande inférieure qui correspond à l'enzyme sans le peptide signal (figure 30-C, piste 2). Curieusement, cette bande est toujours visible, du moins partiellement, après solubilisation des membranes avec le Triton et digestion avec la PK (figure 30-C, piste 3).

Mis ensemble, ces résultats montrent que, dans nos conditions expérimentales, la majorité des microsomes sont intacts et qu'ils peuvent être utilisés pour étudier l'insertion membranaire d'une protéine. Nous avons réalisé cette expérience avec les 2 constructions p40-GFP et GFP-p40 en même temps que les expériences contrôles.

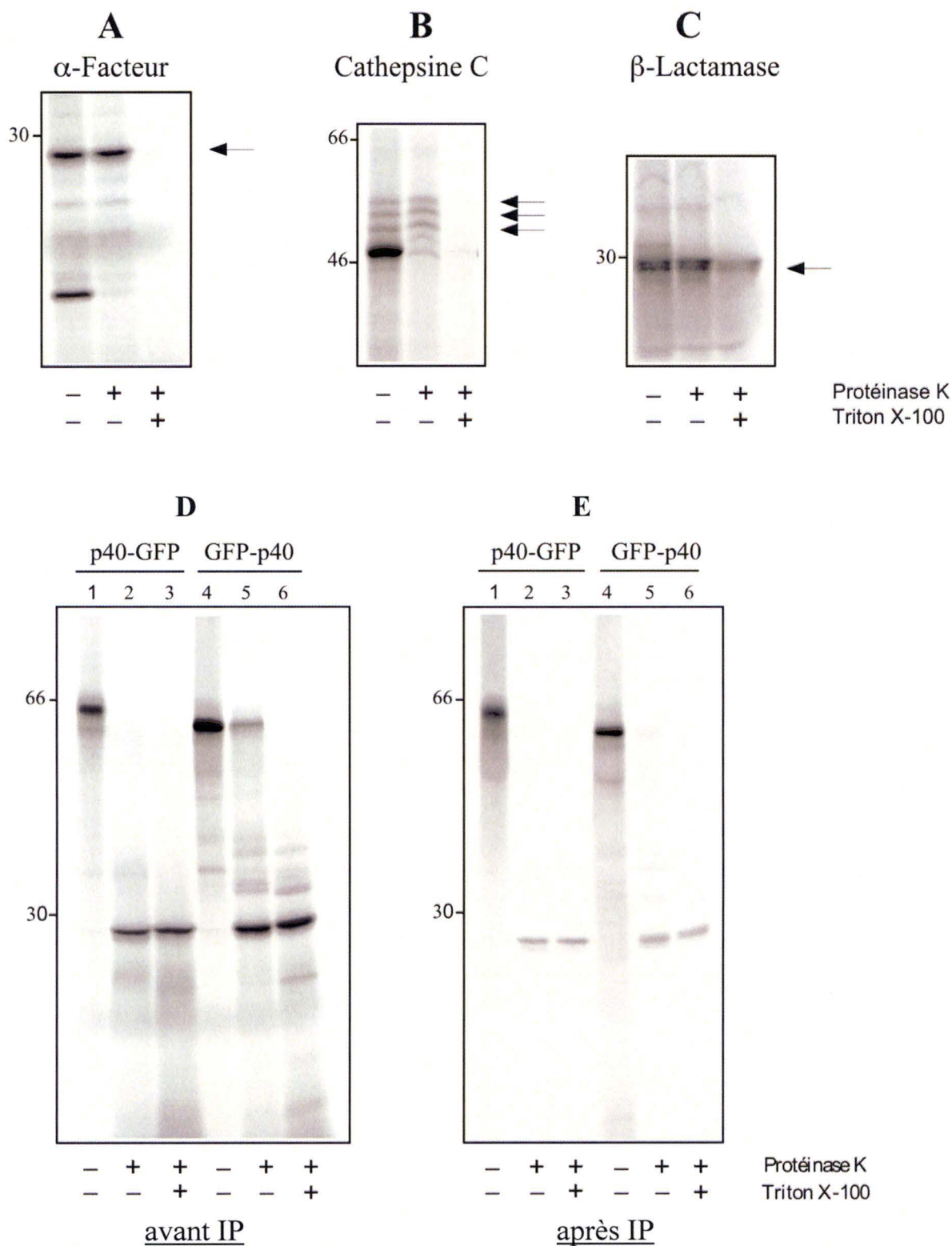
Les pistes 1 et 4 de la figure 31-A montrent p40-GFP et GFP-p40 après traduction *in vitro* en présence de microsomes. Pour chacune de ces constructions, nous n'observons qu'une seule bande dont le PM apparent est similaire à celui obtenu lors de la traduction *in vitro* en absence de microsomes (voir figure 26-A, pistes 2-3 et figure 26-B). La différence de PM apparaît nettement sur ce gel qui est composé de 12 % d'acrylamide/ bisacrylamide.

Après digestion à la PK (figure 31-A, pistes 2 et 5), les bandes de 63 et 59 kDa disparaissent mais, dans les 2 cas, une bande légèrement inférieure à 30 kDa apparaît. Vu sa taille, il se pourrait qu'elle corresponde à la protéine GFP couplée (ou non) à un petit fragment de p40. Néanmoins, nous ne pouvons pas dire que ce fragment polypeptidique est protégé par la membrane puisqu'il est toujours présent lorsque la digestion avec la PK a lieu en présence de détergent (figure 31-A, pistes 3 et 6).

L'immunoprécipitation, réalisée avec l'anticorps anti-GFP sur les deux tiers restants des mixtures de traduction, confirme que la bande d'environ 27 kDa obtenue après digestion à la PK renferme bien la GFP (figure 31-B). Cependant, il faut bien admettre que le rendement de l'immunoprécipitation n'est pas très bon. Il n'est pas exclu que ce résultat s'explique par une dégradation partielle des anticorps suite à la présence d'une activité résiduelle protéolytique.

Ces résultats soulèvent la question suivante : pourquoi la GFP résiste à la digestion à la protéinase K, même après solubilisation des membranes avec un détergent ? Pour tenter de répondre à cette question, nous avons recommencé l'expérience en utilisant une fraction P de foie de rat au lieu des microsomes de Promega (figures 32).

Les résultats de nos expériences contrôles indiquent que les microsomes de foie de rat permettent d'obtenir un niveau de glycosylation de l' α -facteur (figure 32-A) nettement



Figures 32 : Digestion avec la Protéinase K en présence d'une fraction P de foie de rat

Les mixtures de traduction *in vitro*, contenant une fraction P de foie de rat (fraîchement préparée) ont été soumises à l'action protéolytique de la protéinase K (100 µg/ml) pendant 1 h sur la glace, en présence ou absence de Triton X100.

A-B-C : Contrôles de l'intégrité de la membrane des microsomes.

D-E : Digestion de p40-GFP et de GFP-p40, suivie (E) ou non (D) d'une immunoprécipitation avec l'anticorps anti-GFP.

supérieur à celui observé avec les microsomes commerciaux. Par contre, comme dans l'expérience présentée à la figure 29-A, la glycosylation de la cathepsine C (figure 32-B) et le clivage du peptide signal de la β -lactamase (figure 32-C) ne sont pas très efficaces. Ces résultats montrent également que les formes matures de ces 3 protéines persistent après digestion avec la protéinase K (pistes 2). Comme attendu, la cathepsine C et l' α -facteur disparaissent complètement après traitement à la protéinase K si au préalable, la fraction P a été traitée avec du Triton X-100 (pistes 3). En revanche, la β -lactamase ne disparaît que partiellement.

En ce qui concerne les constructions p40-GFP et GFP-p40 (figure 32-D), nous obtenons les mêmes profils que ceux observés en présence de microsomes d'origine commerciale (voir figure 31-A). Autrement dit, pour les 2 constructions chimériques, la digestion avec la PK engendre un seul fragment, de PM inférieur à 30 kDa et ce fragment contient la GFP, comme le montre le résultat de l'immunoprécipitation avec l'anti-GFP (figure 32-E).

Cependant, nous ne pouvons pas dire que ce fragment est protégé par les membranes des microsomes puisqu'il reste apparent après solubilisation des membranes par le Triton X-100.

Les résultats obtenus après la digestion avec la protéinase K en présence de Triton (figures 31-A, 31-B et 32) nous ont fait craindre une résistance intrinsèque de la GFP à l'activité protéolytique de la PK. Ceci a été confirmé en soumettant à l'action de la protéinase K une mixture de traduction ne contenant pas de microsomes mais dans laquelle la protéine GFP-p40 est exprimée (figure 33). Les résultats de cette expérience nous montrent que lorsque la protéine GFP-p40 n'est pas insérée dans la membrane des microsomes, elle est en grande partie digérée par la protéinase K mais il subsiste une chaîne peptidique d'environ 27 kDa correspondant probablement à la GFP restée intacte.

En résumé, nous pouvons dire que p40, dans les 2 constructions chimériques, est en grande partie dégradée lors de l'incubation des microsomes avec la protéinase K, tout comme l'était p40-WT (voir figure 13). Deuxièmement, le fragment issu de la digestion de GFP-p40 ou de p40-GFP avec la protéinase K, n'est pas protégé par les membranes. Il semble qu'il soit simplement résistant à l'action protéolytique de la protéinase K. Par conséquent, la stratégie choisie ne nous permettra pas de préciser l'orientation des extrémités N- et C-terminales de p40.

3.4. DIGESTION DES PROTÉINES CHIMÉRIQUES AVEC LA TRYPSINE

Etant donné que la GFP résiste à l'action de la PK même en absence de membranes (figure 33), nous avons soumis nos échantillons à une digestion à la trypsine, toujours dans l'espoir de pouvoir déterminer l'orientation des extrémités N- et C-terminales de p40.

La trypsine est une endopeptidase qui hydrolyse les liaisons peptidiques après les acides aminés basiques comme la lysine et l'arginine. Les sites de clivage dans une protéine sont donc moins nombreux que ceux reconnus par la protéinase K, qui est moins spécifique. Selon le modèle décrit à la figure 7, la digestion tryptique de p40-WT, insérée dans la membrane, devrait conduire à l'obtention de 3-4 fragments détectables sur gel d'acrylamide après autoradiographie (voir tableau III).

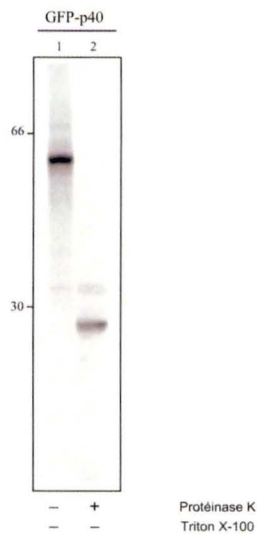


Figure 33 : Digestion avec la Protéinase K de GFP-p40 en absence de microsomes

La protéine a été exprimée dans un lysat de réticulocytes en absence de microsomes. Ensuite, un échantillon a été soumis à l'action protéolytique de la protéinase K (100 µg/ml) pendant 1 h sur la glace. Après arrêt de la digestion avec du PMSF 5 mM, les fragments peptidiques renfermant la GFP ont été immunoprécipités avec l'anticorps anti-GFP et déposés sur un gel d'acrylamide 12 %.

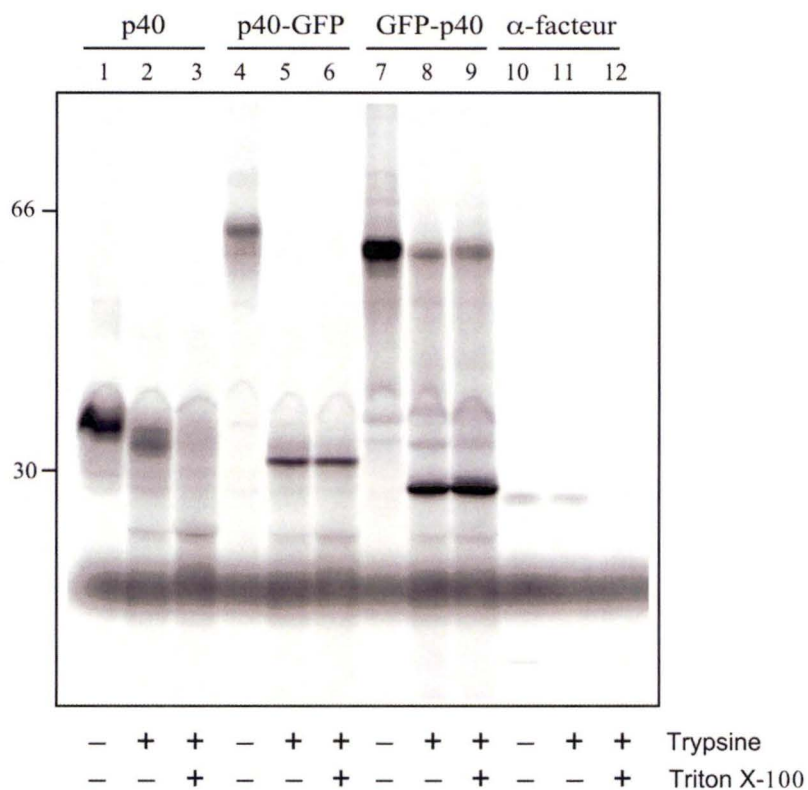


Figure 34 : Digestion trypsique des protéines p40 exprimées en présence d'une fraction P de foie de rat

Les mixtures de traduction *in vitro*, contenant une fraction P de foie de rat, ont été incubées pendant 1 h sur la glace en présence ou absence de trypsine (100 µg/ml). Dans certains cas, du Triton X-100 1 % a été ajouté avant la trypsine pour solubiliser les membranes. La réaction a été arrêtée par addition de SBTI (1 mg/ml). Un échantillon de chaque mixture a été solubilisé et déposé sur un gel d'acrylamide 12 %.

Tableau III : Fragments générés par la digestion de p40 à la trypsine selon le modèle de prédiction présenté à la figure 7

Fragment	Nombre d'AAs	Nombre de Met	PM estimé
1	45	2	5 kDa
2	121	5	13,4 kDa
3	71	3	7,9 kDa
4	80	2	8,9 kDa
+ quelques fragments de faible PM			

Dans nos protéines chimériques, selon les modèles de prédiction (figure 7), la greffe de la GFP au niveau de l'extrémité N-terminale de p40 (GFP-p40) devrait augmenter la taille du premier fragment d'une trentaine de kDa (→ 32,3 kDa). Son ajout au niveau de l'extrémité C-terminale ne devrait *a priori* rien changer car, la GFP se trouverait à l'extérieur des microsomes et devrait être digérée par la trypsine. Par contre, si l'orientation des extrémités N- et C-terminales est inversée par rapport au modèle retenu, la GFP devrait être dégradée lorsqu'elle est greffée en position N-terminale. Dans ce cas, l'extrémité C-terminale contenant la GFP pourrait atteindre une taille de 38,1 kDa.

Nous avons exprimé *in vitro* les protéines p40-WT, les 2 protéines chimériques (p40-GFP et GFP-p40) et l' α -facteur (comme contrôle) dans une mixture contenant un lysat de réticulocytes et des microsomes Promega. Nous les avons ensuite soumis à une digestion trypsique en nous basant sur un protocole décrit dans la littérature (Wo et Oswald, 1995). Dans cette expérience, la forme mature de l' α -facteur était complètement dégradée (résultat non montré). Par conséquent, nous avons recommencé l'expérience en utilisant une fraction P de foie de rat fraîchement préparée. Comme précédemment avec la protéinase K, après une heure d'incubation à 30°C, les mixtures de traduction ont été divisées en 3 : pas de digestion, digestion avec la trypsine (100 µg/ml), digestion avec la trypsine en présence de Triton X-100 1%. Après arrêt de la digestion avec un inhibiteur spécifique de la trypsine (SBTI), un tiers du volume de chaque échantillon a été déposé sur gel d'acrylamide 12 %. Les résultats sont présentés à la figure 34.

La membrane des microsomes semble intacte dans cette expérience puisque la forme glycosylée de l' α -facteur résiste à la digestion trypsique en absence de Triton X-100 (pistes 10 et 11). En absence de traitement, p40 migre avec le PM apparent habituel (piste 1). Après digestion trypsique, une bande d'intensité plus faible, correspondant à un peptide de plus petite taille est observée (piste 2). Ce peptide semble être protégé par la membrane puisqu'il disparaît lorsqu'il est soumis à une digestion trypsique en présence de Triton X-100 (piste 3). Ce résultat contredit les résultats obtenus avec la protéinase K qui semblaient indiquer que p40 était en grande partie exposée sur la face externe des microsomes (voir figure 13). Le résultat obtenu ici avec la digestion trypsique de p40-WT pourrait laisser penser que p40 n'est pas une protéine polytopique mais qu'au contraire, elle ne posséderait qu'un segment transmembranaire et une courte queue C-terminale cytosolique, comme les protéines LAMPs des lysosomes. La chaîne peptidique de taille à peine inférieure à celle de la protéine non traitée, correspondrait alors à la protéine p40 dont la queue C-terminale serait dégradée par la trypsine. Cependant, si p40 avait une topologie membranaire similaire à celle des protéines LAMPs, la protéine devrait être en grande partie résistante à la digestion avec la protéinase K, ce qui n'est pas le cas. Cette résistance partielle de p40-WT à l'action protéolytique de la trypsine pourrait résulter des propriétés intrinsèques de la protéine p40 ou du moins à l'inaccessibilité des sites de clivage.

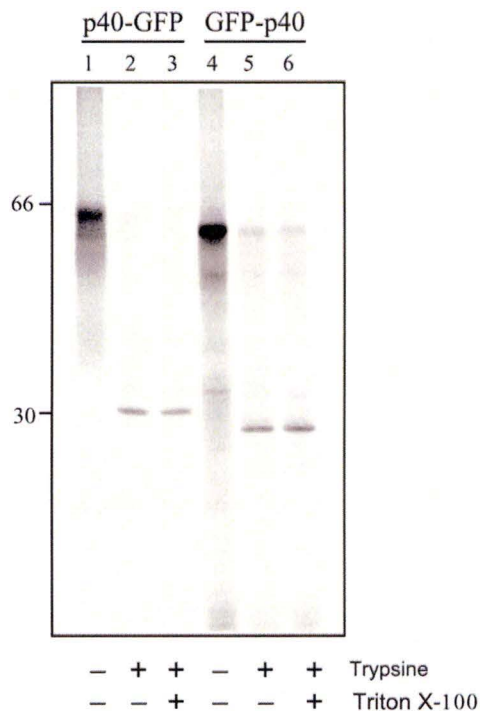


Figure 35 : Immunoprécipitation des fragments issus de la digestion trypsique de p40-GFP et de GFP-p40, exprimées en présence d'une fraction P de foie de rat

Les mixtures de traduction *in vitro* ont été traitées de la même façon que celle décrite dans la légende de la figure 34 mais dans ce cas, les échantillons ont été soumis à une immunoprécipitation avec l'anticorps anti-GFP avant l'électrophorèse.

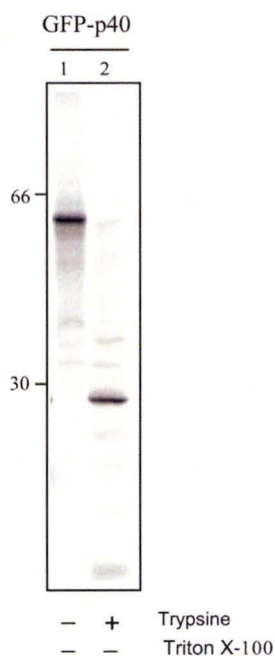


Figure 36 : Digestion trypsique de GFP-p40 exprimée en absence de microsomes

La protéine GFP-p40 a été exprimée dans un lysat de réticulocytes, en absence de microsomes. Ensuite, un échantillon a été soumis à l'action de la trypsine (100 µg/ml) pendant une heure sur la glace. Après la digestion, arrêtée avec du SBTI (1 mg/ml), les fragments peptidiques, renfermant la GFP, ont été immunoprécipités avec l'anticorps anti-GFP et déposés sur un gel d'acrylamide 12 %.

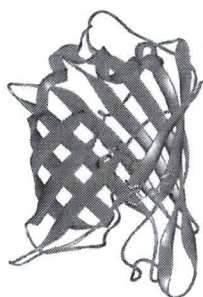
En ce qui concerne p40-GFP, en absence de traitement, nous obtenons une bande de PM semblable à celle observée dans les expériences précédentes (figure 34, piste 4). Suite à l'action de la trypsine, cette chaîne peptidique de 63 kDa disparaît mais une autre protéine, de 30 kDa, apparaît (piste 5). Cette bande de 30 kDa est toujours visible après solubilisation des membranes avec le Triton X100 (piste 6) et ne correspond donc pas à une chaîne peptidique protégée de la protéolyse par la membrane microsomale.

Le même genre de profil apparaît avec GFP-p40 mais, cette fois, le fragment obtenu après la digestion par la trypsine est de taille plus petite qu'avec la construction p40-GFP, soit environ 28 kDa (figure 34, pistes 8-9). Notons aussi que la digestion semble incomplète puisqu'une bande de 59 kDa, correspondant à la forme non traitée, est toujours présente mais en quantité plus faible (piste 8).

Pour vérifier si les fragments, obtenus lors de la digestion tryptique des protéines chimériques, contenaient la GFP, nous avons immunoprécipité le reste de nos échantillons avec l'anticorps anti-GFP. Les résultats présentés à la figure 35 montrent que, comme avec la protéinase K, les 2 fragments issus de la digestion tryptique renferment la GFP. La seule différence porte sur le PM apparent du fragment généré par la digestion tryptique de p40-GFP et par celle de GFP-p40. Cela semble indiquer que dans la construction p40-GFP, la GFP est associée à des acides aminés appartenant à p40 ou à une séquence charnière (les 7 acides aminés entre les 2 protéines ou les 26 acides aminés qui se trouvent en aval de la GFP, avant le codon stop). La différence de poids moléculaire observée après digestion de p40-GFP avec les deux protéases pourrait être liée à l'activité plus restrictive de la trypsine par rapport à la protéinase K.

Notons aussi que cette résistance à l'action de la trypsine n'est pas due à l'adsorption de la GFP dans la membrane des microsomes puisque le même fragment de 27 kDa apparaît également lorsque la trypsine est ajoutée dans un milieu de traduction dépourvu de microsomes (figure 36). Théoriquement, la digestion de la GFP avec la trypsine aurait dû générer 21 fragments de petite taille.

Nous ne nous attendions pas à ces résultats puisque cette stratégie a été utilisée pour étudier la topologie membranaire de la Deprhine (Bossing et Brand, 2002). Nous avons effectué une recherche bibliographique afin de comprendre la résistance observée de la GFP aux 2 protéases que nous avons utilisées. Nous avons ainsi appris que la structure tridimensionnelle



de la GFP pourrait expliquer sa résistance à la protéolyse. La GFP est constituée d'une hélice centrale (contenant le chromophore) entourée de 11 tonneaux β . Les tonneaux forment un cylindre presque parfait de 42 Å de long et de 24 Å de diamètre (figure ci-contre). Le sommet du cylindre est coiffé de 3 courts segments en forme d'hélice distordue tandis que la base n'est recouverte que d'un seul segment de ce genre (Ormo et al., 1996). Selon ces auteurs, le réseau formé par les nombreuses liaisons hydrogène à la surface du cylindre expliquerait la stabilité inhabituelle de la protéine lors des tentatives de dénaturation ou de protéolyse.

Dans l'article de Bossing et collaborateurs, les auteurs avaient étudié la topologie membranaire de la Deprhine en greffant la GFP à son extrémité C-terminale (Bossing et Brand, 2002). Ils avaient conclu que cette protéine était insérée dans la membrane plasmique avec son extrémité C-terminale orientée vers le cytosol puisque la GFP n'était pas dégradée après l'ajout de protéinase K dans le milieu de culture. Cependant, il semble qu'ils n'aient pas vérifié si la GFP était détruite après solubilisation de la membrane plasmique avec un

Tableau IV Taille des principaux fragments éventuellement générés par la digestion trypsique de p40, de p40-GFP et de GFP-p40, selon les modèles de prédiction qui considèrent que p40 renferme 9 segments transmembranaires.

Protéine	Topologie membranaire	Digestion trypsique
<p><u>p40-GFP</u></p> <p>N_{Int}/C_{Ext}</p>		<p>5 kDa 13,4 kDa 7,9 kDa 9,8 kDa ~30 kDa</p>
<p>N_{Ext}/C_{Int}</p>		<p>7,1 kDa 7,1 kDa 6,7 kDa 9,1 kDa 38,1 kDa</p>
<p><u>GFP-p40</u></p> <p>N_{Int}/C_{Ext}</p>		<p>32,2 kDa 13,4 kDa 7,9 kDa 9,8 kDa</p>
<p>N_{Ext}/C_{Int}</p>		<p>27,8 kDa 7,1 kDa 7,1 kDa 6,7 kDa 9,1 kDa 8,0 kDa</p>

détergent. Au vu de nos résultats concernant la résistance de la GFP à la protéolyse (Ormo et al., 1996), une certaine prudence s'impose quant aux conclusions des travaux sur la topologie de la Deprine (Bossing et Brand, 2002).

Tenant compte de la résistance de la GFP à la protéolyse, nous avons essayé de comprendre l'origine des fragments obtenus après digestion trypsique de nos 2 protéines chimériques. Selon la plupart des modèles de prédiction, la protéine p40 renfermerait 9 segments transmembranaires. Cela implique que les extrémités N- et C-terminales sont d'orientations opposées, N_{Int}/C_{Ext} ou N_{Ext}/C_{Int} . Nous avons calculé la taille des fragments qu'il serait possible d'obtenir après digestion trypsique de p40-WT et des 2 constructions GFP, en nous basant sur les 2 orientations possibles (Voir Tableau IV).

Ce tableau montre que pour p40-WT, quelle que soit l'orientation des extrémités N- et C-terminales, il est impossible d'observer une chaîne polypeptidique aussi grande que celle obtenue à la figure 34 (~ 27 kDa). Cela semble indiquer que, dans la conformation adoptée par p40-WT, la trypsine n'a pas accès à tous les sites de clivage. Si, l'extrémité N-terminale est interne et l'extrémité C-terminale est externe, le clivage protéolytique de p40-GFP devrait générer plusieurs fragments dont un d'environ 30 kDa, qui correspondrait à la GFP plus des acides aminés situés de part et d'autre.

Regardons maintenant la protéine chimérique p40-GFP. Si l'extrémité NH_2 est interne et $COOH$ est externe, la GFP se trouve exposée à l'extérieur des microsomes mais, comme elle est résistante à la trypsine, elle ne serait pas dégradée. Des acides aminés situés à proximité de la GFP pourrait bénéficier de sa protection. Dans ce cas, nous devrions observer un fragment de 27 à 30 kDa. C'est ce que nous observons à la figure 34 (piste 5). Dans la situation inverse (N_{Ext}/C_{Int}), un fragment correspondant au dernier segment transmembranaire et l'extrémité C-terminale devraient être protégés en même temps que la GFP, soit un fragment de 38 kDa. La chaîne polypeptidique observée à la figure 34 (piste 5) a un PM plus proche de 30 que de 38 kDa. Ce résultat suggère que l'extrémité C-terminale de p40-GFP serait sur la face externe des microsomes.

En ce qui concerne la GFP-p40, si l'orientation est N_{Int}/C_{Ext} , la GFP est localisée dans la lumière des microsomes. La digestion trypsique en présence de microsomes devrait conduire à l'obtention d'un fragment de 32,2 kDa qui correspond à la GFP à laquelle il faut ajouter l'extrémité N-terminale et le premier segment transmembranaire de p40. Si la protéine GFP-p40 adopte l'orientation inverse (N_{Ext}/C_{Int}), le fragment résistant à la trypsine devrait avoir une taille inférieure, de l'ordre de 27,8 kDa, correspondant à la GFP et à l'extrémité N-terminale de p40. Les standards de PM sur gel de polyacrylamide/ SDS ne donnent qu'une indication sur le poids moléculaire des protéines d'intérêt. Toutefois, compte tenu du PM apparent de la GFP sur les différents gels (figures 31-B, 32-E, 33) et de p40 (figure 10), il semble que le fragment observé sur la figure 34 (piste 8) est plus proche de 27,8 kDa que de 32 kDa. Ce résultat suggère que l'extrémité NH_2 terminale de p40 se trouve également sur la face externe des microsomes. Cela voudrait dire que les 2 extrémités de p40 se trouvent du même côté de la membrane des microsomes et par conséquent, que p40 doit renfermer un nombre pair de segments transmembranaires.

Ceci est en contradiction avec la plupart des modèles de prédiction qui prévoyaient 9 segments transmembranaires. Un seul d'entre eux avançait la possibilité d'avoir seulement 8 hélices α . Selon ce modèle, les extrémités N- et C- terminales seraient du côté extraluminal et la protéine présenterait une grande boucle externe. De ce fait, la digestion trypsique devrait

engendrer des fragments de 5,2 à 8,2 kDa. Avec la GFP greffée en position N-terminale, le fragment résistant à la trypsine devrait avoir un PM de 27,8 kDa tandis que pour cette même greffe en position C-terminale, le fragment devrait avoir un PM de 31,7kDa. Les résultats présentés à la figure 34 sont en accord avec ce modèle mais cela ne veut pas dire pour autant que le modèle (en particulier, le nombre de segments transmembranaires) est correct.

DISCUSSION GENERALE

ET PERSPECTIVES

Depuis quelques années, des études de protéomique subcellulaire ont permis d'identifier de nombreuses protéines, notamment dans les mitochondries, les vésicules de clathrine, les phagosomes et les lysosomes. Notre projet s'inscrit dans un programme de recherche visant à identifier de nouvelles protéines à partir d'une fraction lysosomale de foie de rat. Parmi les protéines déjà découvertes, il y a une protéine de 40 kDa dont la fonction n'est pas inconnue. A l'heure actuelle, Marielle Boonen, dans notre laboratoire, réalise des expériences de colocalisation par microscopie confocale pour vérifier que la protéine p40 appartient réellement au système endo-lysosomal et pas à un organite contaminant l'échantillon de départ. Dans le cadre de notre mémoire, nous avons réalisé une série d'expériences *in vitro* afin de contribuer à l'étude de la topologie membranaire de cette protéine,

Lorsqu'on analyse la structure primaire de p40, on constate que cette protéine renferme beaucoup d'acides aminés hydrophobes (49 %) à tel point que la plupart des modèles de prédiction suggèrent l'existence de 9 segments transmembranaires. Pourtant, parmi ces 9 segments hydrophobes présumés, 8 renferment un ou deux acide(s) aminé(s) chargé(s) et 5 d'entre eux contiennent une ou 2 proline(s).

Il n'est pas rare d'avoir des acides aminés chargés au sein d'un segment transmembranaire. C'est la cas, par exemple, dans la protéine CFTR où 8 des 12 segments transmembranaires, contiennent des acides aminés chargés. Souvent, ces acides aminés se trouvent au centre du segment hydrophobe et forment des liaisons ioniques avec des acides aminés situés sur un segment transmembranaire voisin. Cela évite la rétention de la protéine au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique et sa dégradation intracellulaire qui peuvent se produire lorsqu'un acide aminé chargé réside dans un segment transmembranaire (Tector et Hartl, 1999). Dans le cas du CFTR, les 3 résidus basiques présents dans le sixième segment transmembranaire (TM6) ne semblent pas impliqués dans des liaisons ioniques avec des acides aminés acides. Au contraire, ils semblent jouer un rôle important dans la fonction de canal chlore assurée par le CFTR. Toutefois, la présence de ces 3 acides aminés chargés dans TM6 réduit considérablement les propriétés d'ancrage de ce segment. Si TM6 est retenu dans la membrane du réticulum endoplasmique, c'est grâce à des interactions avec la machinerie de translocation et avec les domaines cytosoliques du CFTR (Tector et Hartl, 1999).

La présence d'une proline au sein d'un segment transmembranaire peut aussi atténuer la rétention membranaire d'une protéine parce que la proline, comme la glycine d'ailleurs, forme un coude dans les hélices α (Barlow et Thornton, 1988). Cependant beaucoup de protéines renferment une proline dans leur segment transmembranaire. Par exemple, le récepteur à l'insuline contient une séquence GlyPro dans le segment transmembranaire de la chaîne β . Or, une étude réalisée dans les années 90, a montré que la substitution de la proline et de la glycine par une alanine (favorable à la formation d'une hélice α idéale) accélérerait d'un facteur 2 la vitesse d'internalisation du récepteur couplé à l'insuline (Goncalves et al., 1993). Sur base de cette observation, les auteurs de cette étude ont suggéré que l'hélice α optimisée favorisait la diffusion latérale du récepteur dans la bicouche lipidique, peut-être en permettant des interactions avec des composants lipidiques de la membrane plasmique ou des interactions avec d'autres protéines associées à la membrane (Goncalves et al., 1993).

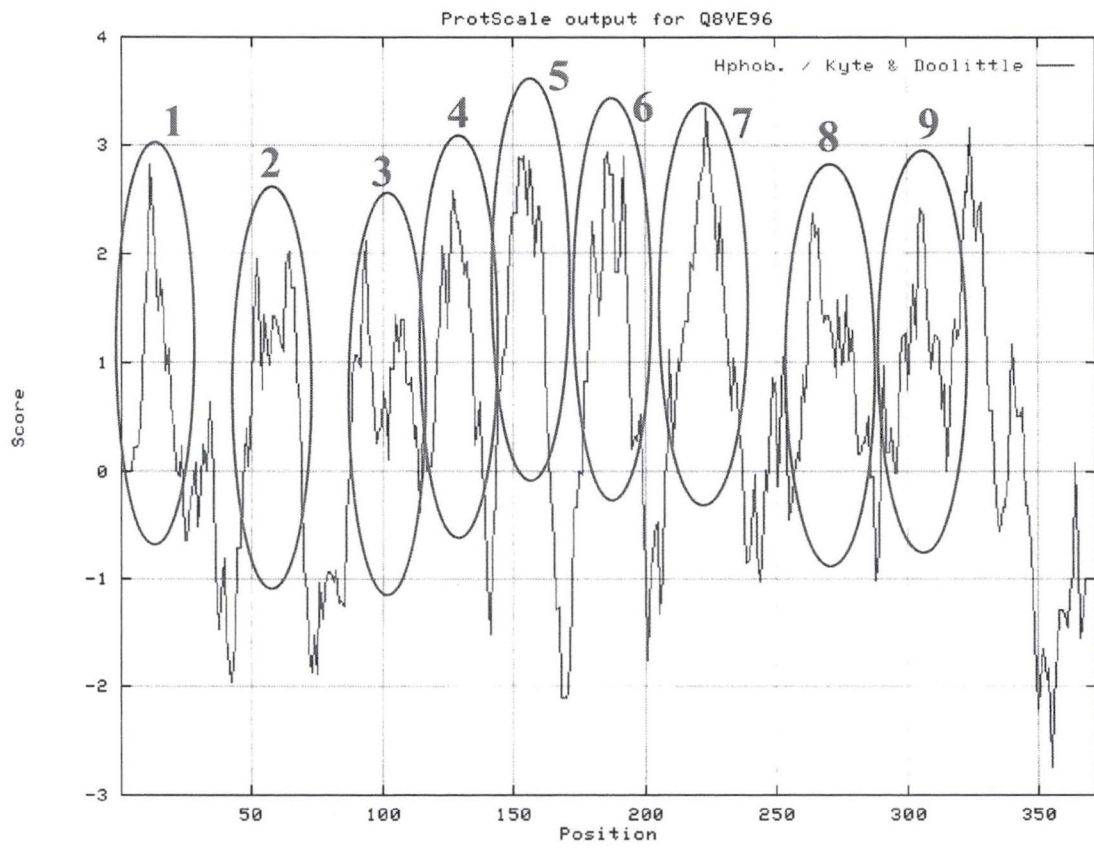


Figure 37 : Profil d'hydrophobicité de p40

(<http://www.expasy.ch>)

Tenant compte de ces remarques, il est vraiment difficile de prédire la topologie membranaire réelle de la protéine p40 rien qu'en se basant sur son profil d'hydrophobicité (figure 37). Outre le fait que certains segments transmembranaires présumés ne sont pas hydrophobes sur toute leur longueur (reflet de la présence d'acides aminés chargés), l'analyse de ce profil révèle que la distance entre des segments hydrophobes successifs n'est généralement pas grande. Dès lors, il faut utiliser les modèles de prédiction avec beaucoup de précaution, même si la plupart d'entre eux prévoient la présence de 9 segments transmembranaires dans p40 (<http://www.expasy.ch>).

Regardons maintenant les sites potentiels de N-glycosylation. Ils pourraient éventuellement nous éclairer sur l'orientation membranaire de p40 puisque le processus de N-glycosylation se déroule dans la lumière du réticulum endoplasmique, pendant la translocation de la protéine naissante à travers la membrane. Il existe 3 sites potentiels de N-glycosylation dans la séquence primaire de p40. Deux d'entre eux se trouvent dans un segment hydrophobe et le troisième dans une petite boucle hydrophile, juste en aval d'un segment hydrophobe. *A priori*, vu leur localisation, ils ne peuvent donc pas nous aider dans notre démarche. Cela s'est confirmé expérimentalement : l'addition de microsomes dans une mixture de traduction *in vitro* exprimant p40-WT, ne provoque pas l'apparition d'une bande supplémentaire, correspondant à une chaîne peptidique glycosylée (figure 10).

Dès lors, nous avons entrepris une série d'expériences *in vitro*, visant à déterminer si p40-WT est effectivement une protéine membranaire intégrale. D'abord, nous avons réalisé une partition dans le Triton X114. Cette expérience a montré que, comme prévu, la protéine accompagnait le détergent lors de la séparation de phase à 30°C (figure 11). Certains auteurs utilisent cet argument pour affirmer que leur protéine d'intérêt est transmembranaire (Lin et al., 2001). Cependant, il se pourrait que la partition d'une protéine, comme p40, dans la phase détergent résulte simplement de son caractère hydrophobe même si elle n'est pas insérée dans une membrane.

Ensuite, nous avons réalisé des expériences d'extraction au carbonate à pH 11.5. Cette technique est souvent utilisée pour déterminer si une protéine est fortement liée à la membrane par l'intermédiaire d'un segment transmembranaire ou d'une ancre lipidique (Bascom et al., 1999; Schlegel et al., 2001; Skach et al., 1994). P40, exprimée en présence d'un lysat de réticulocytes et de microsomes, se retrouve dans le culot membranaire après sédimentation des microsomes par centrifugation à haute vitesse sur coussin de saccharose (figure 12-A). De plus, une quantité non négligeable reste associée aux membranes après traitement avec le carbonate de sodium à pH 11.5 (figure 12-B). Ceci est un argument en faveur d'une insertion membranaire de p40 dans les microsomes mais il faut être prudents. Peut-être la protéine pourrait-elle être simplement adsorbée sur la membrane via des interactions avec des composants lipidiques.

Finalement, nous avons testé la résistance à la protéinase K de p40, exprimé dans notre système de traduction *in vitro* en présence de microsomes. La protéinase K est une endoprotéase qui hydrolyse le lien peptidique entre de nombreux acides aminés. Lorsqu'elle est ajoutée en excès dans un système de traduction *in vitro* contenant des microsomes, elle est capable de cliver tous les segments externes des protéines. Les segments transmembranaires et luminaux résistent à cette digestion grâce à la barrière lipidique que constitue la membrane des microsomes. Lorsque nous avons réalisé cette expérience avec p40-WT, nous n'avons observé aucun fragment peptidique, même sur des gels Tris-Tricine, plus appropriés pour observer des peptides de petite taille (figures 13 A-B). Il est vrai que si p40 renferme de nombreux segments transmembranaires, les fragments protégés par la membrane doivent

avoir une taille de l'ordre de 7 kDa et certains ne possèdent qu'une seule méthionine. Il est donc possible qu'ils aient échappés à la détection. De plus, nous ne pouvons pas exclure la possibilité que ces fragments aient diffusé en dehors du gel pendant la migration électrophorétique et la fixation du gel.

Dans un deuxième temps, nous avons profité du fait que 40-WT n'était pas glycosylé pour étudier sa topologie membranaire en insérant un site consensus de N-glycosylation (NGS ou NSS) soit dans la première soit dans la deuxième boucle hydrophile de p40. Nous avons ainsi généré 2 protéines mutantes : G37N et A77N. Aucune de ces protéines n'est glycosylée ni dans notre système de traduction *in vitro* (contenant des microsomes d'origine commerciale ou des microsomes de foie de rat) ni dans des cellules COS transfectées avec l'ADNc codant pour p40 muté (figures 20, 22, 23). L'absence de glycosylation pourrait s'expliquer par la présence des séquences NGS et NSS sur la face externe des microsomes. Comme alternative, nous pensons qu'elle serait due à la trop courte distance entre les séquences NxS et les segments transmembranaires situés hypothétiquement de part et d'autre. Idéalement, il faudrait insérer la séquence NxS dans une boucle hydrophile de plus grande taille mais il n'en existe pas, naturellement, dans la séquence de p40. Il faudrait donc accroître la taille d'une boucle hydrophile existante en insérant une vingtaine d'acides aminés supplémentaires pour permettre au site consensus de glycosylation de se trouver à une distance minimale de 15 acides aminés du segment hydrophobe le plus proche (Nilsson et von Heijne, 1993). Toutefois, cela risquerait de modifier la topologie membranaire de p40 mais cela permettrait au moins de s'assurer que la protéine p40 est effectivement transmembranaire.

Dans un troisième temps, nous avons construit 2 protéines chimériques dans lesquelles la séquence de la GFP a été greffée à l'extrémité N-terminale (GFP-p40) ou C-terminale (p40-GFP) de p40. Le but était 1) de soumettre ces protéines chimériques à l'action d'une protéase (protéinase K ou trypsine) après avoir été exprimée dans un lysat de réticulocytes en présence de microsomes et 2) de réaliser une immunoprécipitation avec un anticorps anti-GFP afin de récolter les fragments contenant la GFP, éventuellement protégés par les membranes. Nous avons choisi la GFP comme protéine « reporter » parce qu'elle a un poids moléculaire de 27 kDa. Elle est donc nettement plus facile à visualiser sur un gel que des fragments de 7 kDa, comme attendu dans le cas avec p40-WT. De plus, ces constructions peuvent servir également aux études de localisation intracellulaire de p40 en microscopie confocale. Nos résultats expérimentaux montrent que la digestion des 2 constructions chimériques avec la protéinase K et la trypsine conduit à l'obtention d'un fragment peptidique d'une trentaine de kDa qui renferme la GFP (figures 31, 32, 35). Cependant, ce fragment est également visible lorsque la digestion a lieu en présence de détergent. Cela suggère que ce fragment de ~30 kDa n'est pas protégé par la membrane des microsomes. De plus, ce fragment apparaît aussi quand la protéase est ajoutée dans une mixture de traduction *in vitro* ne contenant pas de microsomes. Cette résistance de la GFP à la protéolyse devrait donc être attribuée à des propriétés intrinsèques de la GFP. En parcourant la littérature, nous nous sommes en effet aperçus que la résistance protéolytique à sa structure tridimensionnelle particulière (Ormo et al., 1996). Il est donc difficile de tirer des conclusions sur base des résultats obtenus avec les constructions chimériques.

Cependant, le seul fragment généré par la digestion trypsique de la construction p40-GFP est plus grand que celui obtenu avec la construction GFP-p40. Dès lors, nous avons calculé la taille des fragments tryptiques potentiels, en considérant les deux orientations possibles (N_{int}/C_{ext} ou N_{ext}/C_{int}) d'un modèle de p40 contenant 9 segments transmembranaires. En comparant la taille de ces fragments avec la taille des fragments obtenus pour les 2 constructions, p40-GFP et GFP-p40, nous sommes arrivés à la conclusion que les deux

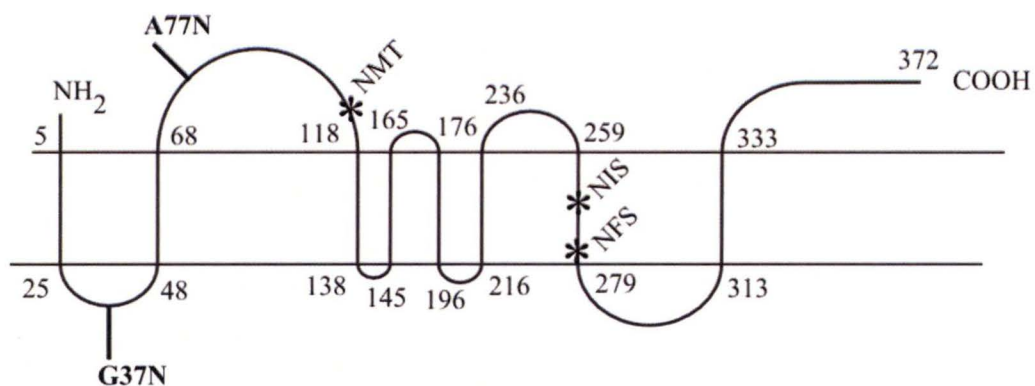


Figure 38 : Topologie membranaire de p40 avec 8 segments transmembranaires, selon le modèle de prédiction proposé par le logiciel TopPred

(<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/toppred.html>)

extrémités N- et C-terminales se trouvent sur la face externe des microsomes. Evidemment, cela soulève la question de savoir si la protéine est réellement ancrée dans la membrane. La question est d'autant plus critique pour la construction GFP-p40 où la présence de la GFP du côté N-terminale pourrait interférer avec la translocation de p40 à travers la membrane des microsomes. Cependant, les résultats obtenus avec l'extraction au carbonate à pH 11.5 nous rassurent sur ce point puisqu'une proportion non négligeable de la protéine GFP-p40 semble fortement associée aux membranes. Ceci suggère que la protéine est ancrée dans la membrane. Par conséquent, si la protéine est effectivement insérée dans la membrane des microsomes et si les extrémités N- et C-terminales sont réellement situées sur la face externe des microsomes, la protéine p40 ne peut comporter qu'un nombre pair de segments transmembranaires. Le profil d'hydrophobicité de p40 montre que la distance entre le 4^e et le 5^e segments hydrophobes est particulièrement courte (seulement 8 acides aminés). De plus, le 4^e segment ne renfermerait que 18 acides aminés dont une arginine en position N-terminale. Généralement, les segments de rétention membranaire sont composés de 20 à 23 acides aminés (Barlow et Thornton, 1988). Dès lors, il est possible que le 4^e segment hydrophobe ne soit pas un segment de rétention membranaire et, dans ce cas, l'orientation du 5^e segment hydrophobe serait inversée. Ce modèle a été proposé par le logiciel TopPred¹. Il est représenté à la figure 38. Les résultats que nous avons obtenus avec la trypsine sur les protéines chimériques sont en accord avec ce modèle. D'une part, les 2 extrémités se trouveraient à l'extérieur des microsomes et d'autre part, le plus grand fragment de p40 (8.2 kDa), potentiellement protégé par la membrane, serait trop petit pour être visualisé sur un gel d'acrylamide 12 %.

Voyons si ce modèle peut expliquer les résultats obtenus avec p40-WT et les 2 mutants de glycosylation. Deux des sites consensus de N-glycosylation, présents naturellement dans la séquence de p40-WT (²⁶⁹NIS, ²⁷⁷NFS) se trouveraient dans une hélice α , comme dans le modèle à 9 segments transmembranaires. Le troisième site naturel (¹¹⁰NMT) ainsi que le site de glycosylation ajouté en position 77 (A77N) se trouveraient sur la face externe. Nos résultats expérimentaux semblent indiquer qu'aucun de ces sites ne serait glycosylé, ce qui est en accord avec le modèle comportant 8 segments transmembranaires. Par contre, toujours selon ce modèle, le site de glycosylation ajouté en position 37 devrait être glycosylé. Ce n'est pas le cas mais, comme nous l'avons proposé précédemment, l'absence de glycosylation pourrait s'expliquer par la proximité des segments transmembranaires.

Autrement dit, il semblerait que l'ensemble des résultats expérimentaux obtenus au cours de ce mémoire peuvent s'expliquer par le modèle qui prédit que p40 renferme 8 segments transmembranaires. Toutefois, il est évident que des expériences complémentaires doivent être réalisées pour appuyer cette proposition. Par exemple, nous pourrions refaire des expériences de digestion protéolytique sur des constructions où la GFP serait remplacée par une autre protéine « reporter ». L'invertase ou l'extrémité C-terminale de la prolactine bovine seraient des candidats parfaits puisqu'ils ont déjà été utilisés pour étudier la topologie membranaire du CFTR (Tector et Hartl, 1999; Carveth et al., 2002).

Les expériences réalisées sur les cellules eucaryotes COS ont confirmé l'absence de glycosylation observée avec notre système de traduction *in vitro*. Par conséquent, nous gardons toute confiance dans ce système, composé d'un lysat de réticulocytes et de microsomes d'origine commerciale ou préparés à partir de foie de rat. Toutefois, nous pourrions aussi utiliser des cellules semi-perméabilisées pour tester la résistance de ces protéines chimériques à l'action protéolytique de la protéinase K. L'expérience consisterait à incuber les cellules en présence de digitonine (un détergent non ionique qui agit

1 (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/toppred.html>)

spécifiquement sur les membranes riches en cholestérol) pendant un court instant pour permettre la formation de pores au sein de la membrane plasmique (Authier et al., 1996). Ensuite, il faudrait ajouter une faible quantité de protéinase K, arrêter la réaction et réaliser une immunoprécipitation avec un anticorps spécifique de la protéine « reporter ». Si cette protéine se trouve sur la face cytosolique du compartiment cellulaire où réside p40 (probablement les lysosomes), elle sera dégradée. Si, au contraire, elle se trouve à l'intérieur de ce compartiment, elle sera protégée et il sera possible de l'immunoprécipiter après arrêt de la protéolyse. Cette technique est envisageable mais elle nécessiterait pas mal de mises au point. Ce type d'expérience permettrait de connaître l'orientation des extrémités N- et C-terminales de p40 mais pas le nombre exact de segments transmembranaires. Pour cela, nous pourrions suivre la même stratégie que celle décrite pour le CFTR (Carveth et al., 2002; Tector et Hartl, 1999). Elle consiste à générer des protéines tronquées après chaque segment hydrophobe et à greffer la protéine « reporter » en position C-terminale. Ensuite, il s'agit d'ajouter la protéinase K et d'analyser l'intégrité de la protéine « reporter » ainsi que la taille du fragment protégé par les membranes, en réalisant une immunoprécipitation suivie d'une électrophorèse. Cette expérience pourrait également être faite en insérant un segment hydrophile contenant un site consensus de N-glycosylation. Il suffit alors de déterminer le degré de glycosylation des protéines tronquées pour en déduire l'orientation du segment transmembranaire situé en amont. De fil en aiguille, on pourrait ainsi obtenir des informations précises sur la topologie membranaire d'une p40.

Une partie de ces résultats a été présentée lors de la 185^e réunion de la Société Belge de Biochimie et de Biologie Moléculaire qui s'est tenue à Namur en novembre 2003.

« Characterisation of a novel protein (p40) identified by mass spectrometry »

I. HAMER¹, M. BOONEN¹, A-F. DELSAUTE¹, L. MERLIN¹, M. BOUSSAC², J. GARIN² and M. JADOT¹
(¹URPHYM, Laboratoire de Chimie Physiologique, FUNDP, Namur (Belgium) and ²Département de Biologie Moléculaire et Structurale, Laboratoire de Chimie des Protéines, CEA, Grenoble (France))

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Andrejewski, N., E.L. Punnonen, G. Guhde, Y. Tanaka, R. Lullmann-Rauch, D. Hartmann, K. von Figura, and P. Saftig. 1999. Normal lysosomal morphology and function in LAMP-1-deficient mice. *J Biol Chem.* 274:12692-701.
- Authier, F., P.H. Cameron, and V. Taupin. 1996. Association of insulin-degrading enzyme with a 70 kDa cytosolic protein in hepatoma cells. *Biochem J.* 319 (Pt 1):149-58.
- Barlow, D.J., and J.M. Thornton. 1988. Helix geometry in proteins. *J Mol Biol.* 201:601-19.
- Bascom, R.A., S. Srinivasan, and R.L. Nussbaum. 1999. Identification and characterization of golgin-84, a novel Golgi integral membrane protein with a cytoplasmic coiled-coil domain. *J Biol Chem.* 274:2953-62.
- Bell, A.W., M.A. Ward, W.P. Blackstock, H.N. Freeman, J.S. Choudhary, A.P. Lewis, D. Chotai, A. Fazel, J.N. Gushue, J. Paiement, S. Palcy, E. Chevet, M. Lafreniere-Roula, R. Solari, D.Y. Thomas, A. Rowley, and J.J. Bergeron. 2001. Proteomics characterization of abundant Golgi membrane proteins. *J Biol Chem.* 276:5152-65.
- Boehm, M., and J.S. Bonifacino. 2002. Genetic analyses of adaptin function from yeast to mammals. *Gene.* 286:175-86.
- Bonifacino, J.S., and L.M. Traub. 2003. Signals for Sorting of Transmembrane Proteins to Endosomes and Lysosomes. *Annu Rev Biochem.*
- Bordier, C. 1981. Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. *J Biol Chem.* 256:1604-7.
- Borel, A.C., and S.M. Simon. 1996. Biogenesis of polytopic membrane proteins: membrane segments assemble within translocation channels prior to membrane integration. *Cell.* 85:379-89.
- Bossing, T., and A.H. Brand. 2002. Dephrin, a transmembrane ephrin with a unique structure, prevents interneuronal axons from exiting the Drosophila embryonic CNS. *Development.* 129:4205-18.
- Boussac, M. 2001. Etudes protéomiques de compartiments de la voie endocytaire. *Dissertation doctorale, Université de Grenoble I.*
- Braulke, T. 1996. Origin of lysosomal proteins. *Subcell Biochem.* 27:15-49.
- Brunet, S., P. Thibault, E. Gagnon, P. Kearney, J.J. Bergeron, and M. Desjardins. 2003. Organelle proteomics: looking at less to see more. *Trends Cell Biol.* 13:629-38.
- Canfield, W.M., K.F. Johnson, R.D. Ye, W. Gregory, and S. Kornfeld. 1991. Localization of the signal for rapid internalization of the bovine cation-independent mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor-II receptor to amino acids 24-29 of the cytoplasmic tail. *J Biol Chem.* 266:5682-8.
- Carveth, K., T. Buck, V. Anthony, and W.R. Skach. 2002. Cooperativity and flexibility of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator transmembrane segments participate in membrane localization of a charged residue. *J Biol Chem.* 277:39507-14.
- Chang, X.B., Y.X. Hou, T.J. Jensen, and J.R. Riordan. 1994. Mapping of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator membrane topology by glycosylation site insertion. *J Biol Chem.* 269:18572-5.
- Cherqui, S., V. Kalatzis, G. Trugnan, and C. Antignac. 2001. The targeting of cystinosis to the lysosomal membrane requires a tyrosine-based signal and a novel sorting motif. *J Biol Chem.* 276:13314-21.
- De Duve, C., B.C. Pressman, R. Gianetto, R. Wattiaux, and F. Appelmans. 1955. Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *Biochem J.* 60:604-17.
- Dreger, M., L. Bengtsson, T. Schoneberg, H. Otto, and F. Hucho. 2001. Nuclear envelope proteomics: novel integral membrane proteins of the inner nuclear membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:11943-8.
- Eskelinen, E.L., A.L. Illert, Y. Tanaka, G. Schwarzmann, J. Blanz, K. Von Figura, and P. Saftig. 2002. Role of LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy. *Mol Biol Cell.* 13:3355-68.
- Eskelinen, E.L., Y. Tanaka, and P. Saftig. 2003. At the acidic edge: emerging functions for lysosomal membrane proteins. *Trends Cell Biol.* 13:137-45.
- Forgac, M. 1999. Structure and properties of the vacuolar (H⁺)-ATPases. *J Biol Chem.* 274:12951-4.
- Fujiki, Y., A.L. Hubbard, S. Fowler, and P.B. Lazarow. 1982. Isolation of intracellular membranes by means of sodium carbonate treatment: application to endoplasmic reticulum. *J Cell Biol.* 93:97-102.
- Garin, J., R. Diez, S. Kieffer, J.F. Dermine, S. Duclos, E. Gagnon, R. Sadoul, C. Rondeau, and M. Desjardins. 2001. The phagosome proteome: insight into phagosome functions. *J Cell Biol.* 152:165-80.

- Gilmore, R., P. Collins, J. Johnson, K. Kellaris, and P. Rapiejko. 1991. Transcription of full-length and truncated mRNA transcripts to study protein translocation across the endoplasmic reticulum. *Methods Cell Biol.* 34:223-39.
- Glickman, J.N., E. Conibear, and B.M. Pearse. 1989. Specificity of binding of clathrin adaptors to signals on the mannose-6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor. *Embo J.* 8:1041-7.
- Goder, V., and M. Spiess. 2001. Topogenesis of membrane proteins: determinants and dynamics. *FEBS Lett.* 504:87-93.
- Goncalves, E., K. Yamada, H.S. Thatté, J.M. Backer, D.E. Golan, C.R. Kahn, and S.E. Shoelson. 1993. Optimizing transmembrane domain helicity accelerates insulin receptor internalization and lateral mobility. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90:5762-6.
- Guarnieri, F.G., L.M. Arterburn, M.B. Penno, Y. Cha, and J.T. August. 1993. The motif Tyr-X-X-hydrophobic residue mediates lysosomal membrane targeting of lysosome-associated membrane protein 1. *J Biol Chem.* 268:1941-6.
- Hammerle, M.M., A.A. Aleksandrov, X.B. Chang, and J.R. Riordan. 2000. A novel CFTR disease-associated mutation causes addition of an extra N-linked oligosaccharide. *Glycoconj J.* 17:807-13.
- Havelaar, A.C., C.E. Beerens, G.M. Mancini, and F.W. Verheijen. 1999. Transport of organic anions by the lysosomal sialic acid transporter: a functional approach towards the gene for sialic acid storage disease. *FEBS Lett.* 446:65-8.
- Havelaar, A.C., G.M. Mancini, C.E. Beerens, R.M. Souren, and F.W. Verheijen. 1998. Purification of the lysosomal sialic acid transporter. Functional characteristics of a monocarboxylate transporter. *J Biol Chem.* 273:34568-74.
- Hegde, R.S., and V.R. Lingappa. 1997. Membrane protein biogenesis: regulated complexity at the endoplasmic reticulum. *Cell.* 91:575-82.
- High, S., and B. Dobberstein. 1992. Mechanisms that determine the transmembrane disposition of proteins. *Curr Opin Cell Biol.* 4:581-6.
- Holtzman, E. 1989. Lysosomes. Plenum Press, NY-London.
- Hunziker, W., and H.J. Geuze. 1996. Intracellular trafficking of lysosomal membrane proteins. *Bioessays.* 18:379-89.
- Jadot, M., W.M. Canfield, W. Gregory, and S. Kornfeld. 1992. Characterization of the signal for rapid internalization of the bovine mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor-II receptor. *J Biol Chem.* 267:11069-77.
- Jadot, M., S. Wattiaux-De Coninck, and R. Wattiaux. 1989. The permeability of lysosomes to sugars. Effect of diethylstilbestrol on the osmotic activation of lysosomes induced by glucose. *Biochem J.* 262:981-4.
- Johnson, K.F., and S. Kornfeld. 1992. The cytoplasmic tail of the mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor-II receptor has two signals for lysosomal enzyme sorting in the Golgi. *J Cell Biol.* 119:249-57.
- Journet, A., A. Chapel, S. Kieffer, F. Roux, and J. Garin. 2002. Proteomic analysis of human lysosomes: application to monocytic and breast cancer cells. *Proteomics.* 2:1026-40.
- Kalatzis, V., S. Cherqui, C. Antignac, and B. Gasnier. 2001. Cystinosin, the protein defective in cystinosis, is a H(+)-driven lysosomal cystine transporter. *Embo J.* 20:5940-9.
- Kornfeld, S., and I. Mellman. 1989. The biogenesis of lysosomes. *Annu Rev Cell Biol.* 5:483-525.
- Kozak, M. 1991. Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation. *J Biol Chem.* 266:19867-70.
- Kundra, R., and S. Kornfeld. 1999. Asparagine-linked oligosaccharides protect Lamp-1 and Lamp-2 from intracellular proteolysis. *J Biol Chem.* 274:31039-46.
- Kuronita, T., E.L. Eskelinen, H. Fujita, P. Saftig, M. Himeno, and Y. Tanaka. 2002. A role for the lysosomal membrane protein LAMP85 in the biogenesis and maintenance of endosomal and lysosomal morphology. *J Cell Sci.* 115:4117-31.
- Lin, J., Z. Liang, Z. Zhang, and G. Li. 2001. Membrane topography and topogenesis of prenylated Rab acceptor (PRA1). *J Biol Chem.* 276:41733-41.
- Lloyd, J.B. 1996. Metabolite efflux and influx across the lysosome membrane. *Subcell Biochem.* 27:361-86.
- Mainferme, F., R. Wattiaux, and K. von Figura. 1985. Synthesis, transport and processing of cathepsin C in Morris hepatoma 7777 cells and rat hepatocytes. *Eur J Biochem.* 153:211-6.
- Marsh, M. 1989. Endosome and lysosome purification by free-flow electrophoresis. *Methods Cell Biol.* 31:319-34.
- Martoglio, B., M.W. Hofmann, J. Brunner, and B. Dobberstein. 1995. The protein-conducting channel in the membrane of the endoplasmic reticulum is open laterally toward the lipid bilayer. *Cell.* 81:207-14.

- Meyer, C., D. Zizioli, S. Lausmann, E.L. Eskelinen, J. Hamann, P. Saftig, K. von Figura, and P. Schu. 2000. *mu1A*-adaplin-deficient mice: lethality, loss of AP-1 binding and rerouting of mannose 6-phosphate receptors. *Embo J.* 19:2193-203.
- Mothes, W., S.U. Heinrich, R. Graf, I. Nilsson, G. von Heijne, J. Brunner, and T.A. Rapoport. 1997. Molecular mechanism of membrane protein integration into the endoplasmic reticulum. *Cell.* 89:523-33.
- Mullins, C., and J.S. Bonifacino. 2001. The molecular machinery for lysosome biogenesis. *Bioessays.* 23:333-43.
- Nakatsu, F., and H. Ohno. 2003. Adaptor protein complexes as the key regulators of protein sorting in the post-Golgi network. *Cell Struct Funct.* 28:419-29.
- Neufeld, E.F., and V.A. McKusik. 1983. Disorders of lysosomal enzyme synthesis and localization: I-cell disease and pseudo-Hurler polydistrophy, New York. 778-87 pp.
- Nilsson, I.M., and G. von Heijne. 1993. Determination of the distance between the oligosaccharyltransferase active site and the endoplasmic reticulum membrane. *J Biol Chem.* 268:5798-801.
- Nishino, I., J. Fu, K. Tanji, T. Yamada, S. Shimojo, T. Koori, M. Mora, J.E. Riggs, S.J. Oh, Y. Koga, C.M. Sue, A. Yamamoto, N. Murakami, S. Shanske, E. Byrne, E. Bonilla, I. Nonaka, S. DiMauro, and M. Hirano. 2000. Primary LAMP-2 deficiency causes X-linked vacuolar cardiomyopathy and myopathy (Danon disease). *Nature.* 406:906-10.
- Ormo, M., A.B. Cubitt, K. Kallio, L.A. Gross, R.Y. Tsien, and S.J. Remington. 1996. Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science.* 273:1392-5.
- Ozawa, T., Y. Sako, M. Sato, T. Kitamura, and Y. Umezawa. 2003. A genetic approach to identifying mitochondrial proteins. *Nat Biotechnol.* 21:287-93.
- Perara, E., and V.R. Lingappa. 1985. A former amino terminal signal sequence engineered to an internal location directs translocation of both flanking protein domains. *J Cell Biol.* 101:2292-301.
- Raab-Graham, K.F., L.J. Cirilo, A.A. Boettcher, C.M. Radeke, and C.A. Vandenberg. 1999. Membrane topology of the amino-terminal region of the sulfonyleurea receptor. *J Biol Chem.* 274:29122-9.
- Riordan, J.R., J.M. Rommens, B. Kerem, N. Alon, R. Rozmahel, Z. Grzelczak, J. Zielenski, S. Lok, N. Plavsic, J.L. Chou, and et al. 1989. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science.* 245:1066-73.
- Robinson, M.S., and J.S. Bonifacino. 2001. Adaptor-related proteins. *Curr Opin Cell Biol.* 13:444-53.
- Sambrook, J., and D.W. Russel. 2001. Molecular Cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Santilman, V., M. Jadot, and F. Mainferme. 2002. Importance of the propeptide in the biosynthetic maturation of rat cathepsin C. *Eur J Cell Biol.* 81:654-63.
- Schagger, H., and G. von Jagow. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem.* 166:368-79.
- Schlegel, A., P. Arvan, and M.P. Lisanti. 2001. Caveolin-1 binding to endoplasmic reticulum membranes and entry into the regulated secretory pathway are regulated by serine phosphorylation. Protein sorting at the level of the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 276:4398-408.
- Shakin-Eshleman, S.H., S.L. Spitalnik, and L. Kasturi. 1996. The amino acid at the X position of an Asn-X-Ser sequon is an important determinant of N-linked core-glycosylation efficiency. *J Biol Chem.* 271:6363-6.
- Sidrauski, C., R. Chapman, and P. Walter. 1998. The unfolded protein response: an intracellular signalling pathway with many surprising features. *Trends Cell Biol.* 8:245-9.
- Skach, W.R., L.B. Shi, M.C. Calayag, A. Frigeri, V.R. Lingappa, and A.S. Verkman. 1994. Biogenesis and transmembrane topology of the CHIP28 water channel at the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol.* 125:803-15.
- Sleat, D.E., I. Sohar, H. Lackland, J. Majercak, and P. Lobel. 1996. Rat brain contains high levels of mannose-6-phosphorylated glycoproteins including lysosomal enzymes and palmitoyl-protein thioesterase, an enzyme implicated in infantile neuronal lipofuscinosis. *J Biol Chem.* 271:19191-8.
- Tanaka, Y., G. Guhde, A. Suter, E.L. Eskelinen, D. Hartmann, R. Lullmann-Rauch, P.M. Janssen, J. Blanz, K. von Figura, and P. Saftig. 2000. Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in LAMP-2-deficient mice. *Nature.* 406:902-6.
- Taylor, S.W., E. Fahy, and S.S. Ghosh. 2003a. Global organellar proteomics. *Trends Biotechnol.* 21:82-8.
- Taylor, S.W., E. Fahy, B. Zhang, G.M. Glenn, D.E. Warnock, S. Wiley, A.N. Murphy, S.P. Gaucher, R.A. Capaldi, B.W. Gibson, and S.S. Ghosh. 2003b. Characterization of the human heart mitochondrial proteome. *Nat Biotechnol.* 21:281-6.

- Tector, M., and F.U. Hartl. 1999. An unstable transmembrane segment in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Embo J.* 18:6290-8.
- Town, M., G. Jean, S. Cherqui, M. Attard, L. Forestier, S.A. Whitmore, D.F. Callen, O. Gribouval, M. Broyer, G.P. Bates, W. van't Hoff, and C. Antignac. 1998. A novel gene encoding an integral membrane protein is mutated in nephropathic cystinosis. *Nat Genet.* 18:319-24.
- Trowbridge, I.S., J.F. Collawn, and C.R. Hopkins. 1993. Signal-dependent membrane protein trafficking in the endocytic pathway. *Annu Rev Cell Biol.* 9:129-61.
- Van Dyke, R. 1996. Acidification of Lysosomes and Endosomes. *Subcell Biochem.* 27:331-360.
- Wattiaux, R., S. Wattiaux-De Coninck, M.F. Ronveaux-dupal, and F. Dubois. 1978. Isolation of rat liver lysosomes by isopycnic centrifugation in a metrizamide gradient. *J Cell Biol.* 78:349-68.
- Wattiaux, R., M. Wibo, and P. Baudhuin. 1963. Effect of the injection of Triton WR 1339 on the hepatic lysosomes of the rat. *Arch Int Physiol Biochim.* 71:140-2.
- Wo, Z.G., and R.E. Oswald. 1995. A topological analysis of goldfish kainate receptors predicts three transmembrane segments. *J Biol Chem.* 270:2000-9.
- Zhu, Y., and G.E. Conner. 1994. Intermolecular association of lysosomal protein precursors during biosynthesis. *J Biol Chem.* 269:3846-51.